Aus dem Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für
Klinische Pharmakologie
Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. rer. nat. U. Klotz

Klinische Bedeutung von Lipoxygenaseprodukten bei Patienten nach Nierentransplantation und bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin) der
Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Biol.
GUNTER BEYER
aus Chemnitz
(Karl-Marx-Stadt)
1987

Aus dem Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für
Klinische Pharmakologie
Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. rer. nat. U. Klotz

Klinische Bedeutung von Lipoxygenaseprodukten bei Patienten nach Nierentransplantation und bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin) der
Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Biol.
GUNTER BEYER
aus Chemnitz
(Karl-Marx-Stadt)
1987

Dekan: Prof. Dr. med. H.-J. Gerth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. U. Klotz, Stuttgart
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Bockhorn, Frankfurt

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom August 1983 bis zum März 1985 am Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart angefertigt.

Herrn Professor Dr. U. Klotz danke ich herzlich für die Themenstellung und für seine ständige Bereitschaft, bei allen Problemen durch Rat und Diskussion zu helfen.

Weiterhin gebührt Herrn Professor Dr. Dr. Wisser Dank für Arbeitsmöglichkeiten in seinen Labors und für zahlreiche Hinweise und Ratschläge.

Mein Dank gilt ferner Herrn Privatdozent Dr. H. Bockhorn für die materielle Unterstützung dieser Arbeit und für die Bereitstellung von Probenmaterial akut nierentransplantierter Patienten.

Außerdem möchte ich Herrn Privatdozent Dr. H.W. Schneider für hilfreiche Diskussionen und die Bereitstellung von Proben chronisch nierentransplantierter Patienten danken.

Herrn Dr. K.E. Maier danke ich für Biopsieproben von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie, des Zentral-Labors des Robert-Bosch-Krankenhauses, der Station 3 A h der Chirurgischen Universitätskinik Tübingen, des Instituts für Experimentelle Chirurgie und Organtransplantation, der Nephrologischen Ambulanz des Katharinen-Hospitals Stuttgart und des Fraunhofer-Instituts Stuttgart danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. C.O. Meese, Frau Dr. I. Reimann, Frau Dr. C. Fischer, Herrn O. Fürst und Herrn H. Kroemer danke ich

für zahlreiche Anregungen und Diskussionen. Bei Frau S. Stucke möchte ich mich für die engagierte technische Mitarbeit bedanken.

Der Robert-Bosch-Stiftung bin ich für die großzügige materielle Hilfe zu Dank verpflichtet. Die vorliegende Arbeit wurde außerdem aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (Projekt Kl 436/2-1).

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Standards und Referenzsubstanzen	8
2.1.1.	Unmarkiertes Material	8
2.1.2.	Markiertes Material	8
2.1.3.	Aufbewahrung	8
2.2.	Hilfsmittel	10
2.2.1.	Chemikalien	10
2.2.2.	Geräte und Materialien	12
2.3.	Urinproben zur Untersuchung auf LTB_4 und LTC_4	14
2.3.1.	Zusammensetzung der Versuchsgruppen	14
2.3.2.	Kontrollgruppe	14
2.3.3.	Akutphase nach Nierentransplantation	15
2.3.4.	Chronische Phase nach Nierentransplantation	16
2.3.5.	Transport und Lagerung der Urinproben	17
2.4.	Biopsieproben zur Untersuchung der Lipoxygenaseaktivität bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Enddarms	18
2.4.1.	Untersuchte Patienten	18
2.4.2.	Transport und Lagerung der Biopsieproben	18
2.5.	Extraktion von LTB_4 und LTC_4 aus Urin	19
2.6.	Aufarbeitung der Biopsieproben	20
2.6.1.	Proteinbestimmung im Überstand	20
2.6.2.	In vitro-Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität	21
2.6.3.	Extraktion der Lipoxygenaseprodukte	21
2.7.	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	24
2.7.1.	HPLC-System für die anschließende radioimmunologische Bestimmung von LTB_4 und LTC_4 aus Urinproben	25

2.7.2.	HPLC-System für die Fraktionierung von Lipoxygenaseprodukten aus Inkubationsansätzen von Biopsieproben mit ^{14}C-markierter Arachidonsäure	28
2.7.3.	HPLC-System zur Untersuchung des Metabolismus von Leukotrienen im Urin	30
2.7.4.	HPLC-Systeme zur Aufreinigung von markierten Standards	32
2.8.	Probenvorbereitung für anschließende Meßmethoden	33
2.8.1.	Proben für die Radioimmunoassays	33
2.8.2.	Proben für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie	33
2.8.3.	Proben für die Flüssig-Szintillations-Messung (β-Counting)	34
2.8.4.	Proben für die Dünnschichtchromatographie (TLC)	34
2.8.5.	Proben für die UV-Spektroskopie	34
2.8.6.	Zubereitung von standardisierten Substanzen	35
2.9.	Radioimmunoassays zur Messung der Leukotriene B_4 und C_4	36
2.10.	Dünnschicht-Chromatographie für Lipoxygenaseprodukte	39
2.11.	UV-Spektroskopie	42
2.12.	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) von Leukotrien B_4	48
2.13.	Stabilität und Metabolismus von LTB_4 und LTC_4 im Urin	50
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Analytik von Urinproben	52
3.1.1.	Probenvorbereitung	52
3.1.2.	Extraktion mit ODS-Silica	53
3.1.3.	Einfluß der stationären Phase	53

3.1.4.	Einfluß der mobilen Phase	57
3.1.5.	Aufnahmekapazität von ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen	66
3.1.6.	Probenaufarbeitung mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	70
3.2.	Analytik der Biopsieproben	83
3.3.	Messungen mit spezifischen Radioimmunoassays	84
3.4.	Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens	88
3.5.	Stabilität und Metabolismus von LTB_4 und LTC_4	91
3.5.1.	Stabilität in Lösungsmitteln	91
3.5.2.	Stabilität in biologischen Proben	92
3.5.3.	Stabilität während der Probenaufarbeitung	94
3.5.4.	Metabolismus im Urin	94
4.	Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin	98
4.1.	Gruppe der Normalprobanden (Kontrollgruppe)	98
4.1.1.	Einzeldaten	98
4.1.2.	Homogenität der Gruppe der Normalprobanden	99
4.1.3.	Beziehung der täglichen Ausscheidung an Leukotrienen zu anderen Faktoren	101
4.2.	Akutphase nach Nierentransplantation	103
4.2.1.	Patientin 1, 32 Jahre	107
4.2.2.	Patientin 2, 16 Jahre	112
4.2.3.	Patientin 3, 48 Jahre	117
4.2.4.	Patient 4, 41 Jahre	122
4.2.5.	Patient 5, 48 Jahre	127
4.2.6.	Patient 6, 47 Jahre	134
4.2.7.	Patient 7, 49 Jahre	138
4.2.8.	Patient 8, 47 Jahre	142
4.2.9.	Patient 9, 22 Jahre	145

4.2.10.	Patient 10, 49 Jahre	149
4.2.11.	Patient 11, 37 Jahre	153
4.2.12.	Patient 12, 54 Jahre	157
4.3.	Zusammenfassung der Daten über Patienten in der akuten Phase nach Nierentransplantation	163
4.4.	Chronische Phase nach Nierentransplantation	177
4.4.1.	Zusammensetzung der Patientengruppe	177
4.4.2.	Urinausscheidung von LTB_4 und LTC_4 und ihre Beziehung zu anderen Faktoren	184
4.5.	Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten während der akuten bzw. der chronischen Phase nach Nierentransplantation	198
5.	Messungen der Lipoxygenaseaktivität in Biopsieproben	200
5.1.	Zusammensetzung der Patientengruppe	200
5.2.	Charakterisierung der Lipoxygenaseaktivität	201
5.3.	Lipoxygenaseaktivität in gesunder und in entzündeter Colonmukosa	202
6.	Diskussion	207
6.1.	Kombiniertes Extraktionsverfahren für Leukotriene	207
6.2.	Bedeutung der Leukotriene bei Nierentransplantation	214
6.3.	Charakterisierung der Lipoxygenaseaktivität in Biopsieproben	227
7.	Zusammenfassung	230
8.	Literaturverzeichnis	233

Abkürzungsverzeichnis

A	Azathioprin
ACN	Acetonitril
An	Nierenangiographie
5-AS	5-Aminosalicylsäure
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
B	Biopsie
C	Ciclosporin A
C_8-Silica	Octylsilyl-Silica
C_{18}-Silica	Octadecylsilyl-Silica
CMV	Infektion mit Cytomegalie-Virus
CO	Cyclooxygenase
D	Hämodialyse
DCI	Desorption-Chemical-Ionization
EK	Erythrozytenkonzentrat
EtOH	Äthanol
FAB	Fast Atom Bombardment
Ga	Gastroskopie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HAc	Essigsäure
HLA	Humanes Lymphozyten-Antigen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie = Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
I.D.	Innendurchmesser
IgG	Hyperimmunglobulin G
LO	Lipoxygenase
LSC	Liquid Scintillation Counting = Flüssig-Szintillations-Messung
m/z	mass over charge ratio
MeOH	Methanol
NICI	Negativ-Ion-Chemical-Ionization
NP-HPLC	Normal Phase-HPLC
ODS-Silica	Octadecylsilyl-Silica
P	Nierenpunktion
PD	Peritoneal-Dialyse

PIEI	Positive-Ion-Electron-Impact
RP-HPLC	Reverse Phase-HPLC
RSA	Rinderserumalbumin
SA	Salazosulfapyridin
Se	Virus-Serologie
SIM	Selected Ion Monitoring
SP-HPLC	Straight Phase-HPLC
SRS-A	Slow Reacting Substance of Anaphylaxis
Sz	Nierenszintigramm
Th	Röntgen-Thorax
TLC	Thin Layer Chromatographie = Dünnschicht-Chromatographie
US	Ultraschall Nieren

1. Einleitung

Seit dem Beginn der Transplantations-Chirurgie in den 40er Jahren hat die Zahl an Organverpflanzungen kontinuierlich zugenommen. Zusätzlich hat sich das Spektrum erfolgreich transplantierbarer Organe erweitert. Ermöglicht wurde diese Entwicklung durch beträchtliche Fortschritte auf den Gebieten der Diagnostik und Therapie während aller Stadien des Transplantationsgeschehens (1).

Die Prognose eines transplantierten Organs hängt nach heutigem Wissensstand weitgehend von der Zahl und der Intensität der Abstoßungsreaktionen ab (2 - 4), wobei deren Früherkennung unverändert problematisch ist (5). In der klinischen Routine beruht die Diagnose einer Abstoßungsreaktion neben der Beachtung der üblichen Labordaten auf der Immunitätslage des Empfängers, z.B. Verhältnis von T-Helfer- zu T-Suppressor-Zellen (6 - 12), auf der Überwachung der Transplantatfunktion, z.B. Sonographie, Computertomographie und Nuklearmedizin (13 - 16) sowie auf der Messung einer Gewebeschädigung, z.B. Bestimmung lysomaler Enzyme im Urin (17 - 20). Die irreversible Organschädigung wird durch Feinnadelpunktion diagnostiziert (21, 22).

Ein neuer Ansatz ergab sich, als man die Bedeutung der Prostaglandine und anderer Folgeprodukte, die sich aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie der Arachidonsäure ableiten, für die Nierenfunktion erkannte (23 - 33) und ihre Rolle bei Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen näher untersucht wurde (34 - 41). Eine Übersicht über die beteiligten Substanzen und ihre mögliche medikamentöse Beeinflussung zeigt Abb. 1.

Nach Gabe von Prostaglandin E_2 (PGE_2) und von Prostacyclin (PGI_2) konnte sowohl tierexperimentell als auch

klinisch eine Verbesserung von Transplantatfunktion und Überlebensrate erzielt werden (16, 42 - 53). Zusätzlich deutete sich ein Zusammenhang zwischen Nierentransplantatabstoßung und erhöhter Urinausscheidung von Thromboxan B_2 (TXB_2 und Metabolit dinor-TXB_2) im Urin, das bereits vor den üblichen klinischen Zeichen des akuten Geschehens nachweisbar war,an (54 - 59). Durch spezifische Hemmstoffe der renalen Thromboxansynthese ließ sich im tierexperimentellen Modell eine Transplantatabstoßung mildern bzw. ganz verhindern (60 - 62). Interessant war außerdem die chemische Verwandtschaft zwischen einigen der benutzten Inhibitoren und dem Immunsuppressivum Azathioprin (63 - 65).

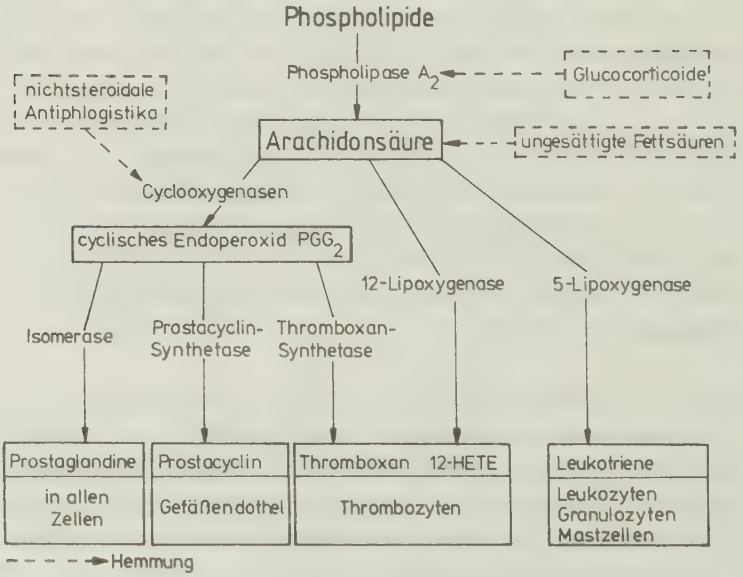


Abb. 1: System der Prostaglandine und Leukotriene (Eicosanoide).

Die entzündungshemmenden Eigenschaften der Glucocorticoide, die über die Wirkung der nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) vom Typ des Aspirins hinausgehen, begrün-

den deren Einsatz bei der akuten Transplantatabstoßungsreaktion, zur Membranabdichtung beim anaphylaktischen Schock und beim Infarktgeschehen sowie bei Kollagenosen. Der Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide beruht auf der Bildung von Peptid-Inhibitoren der Phospholipase A. Dadurch wird die Freisetzung der Arachidonsäure aus Zellmembranen blockiert, so daß weder für die Reaktionen der Cyclooxygenasen noch für die Bildung von Leukotrienen durch Lipoxygenasen Substrat zur Verfügung steht (66 - 68).

Die Leukotriene (Abb. 2) verdanken ihren Trivialnamen der erstmaligen Isolierung aus Leukozyten und der Struktur eines konjugierten Triens (69 - 73). Ihre prinzipiellen pharmakologischen Eigenschaften als Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) wurden bereits 1938 von FELDBERG und KELLAWAY beschrieben (74). Die im Vergleich zu Histamin um mehrere Größenordnungen stärkere bronchospasmogene Wirkung der Leukotriene C_4 und D_4 (LTC_4,LTD_4) kann durch Thromboxan noch potenziert werden (75 - 77). In Gebieten mit funktionellen Endarterien kommt es in nanomolaren Konzentrationen zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion präkapillarer Gefäßreale (78, 79). Zusammen mit den Vasodilatatoren PGE_2 und PGI_2 erhöhen die Sulfidopeptid-Leukotriene (LTC_4, LTD_4, LTE_4) die Membranpermeabilität postkapillarer Venolen und bewirken durch Extravasation von Plasma und Entzündungszellen die Entstehung eines inflammatorischen Ödems (80 - 82).

Leukotrien B_4 (LTB_4) und die anderen offenkettigen Hydroperoxy- und Hydroxy-Eicosatetraensäuren (HPETE, HETE) entfalten ebenfalls in nanomolaren Mengen eine positiv chemotaktische Wirkung auf Leukozyten (83 - 86). Da sie u.a. auch die Degranulation von Histamin und Serotonin sowie die Freisetzung von membrangebundenem Calcium verursachen, kann ein bestehender Entzündungsprozeß auto-

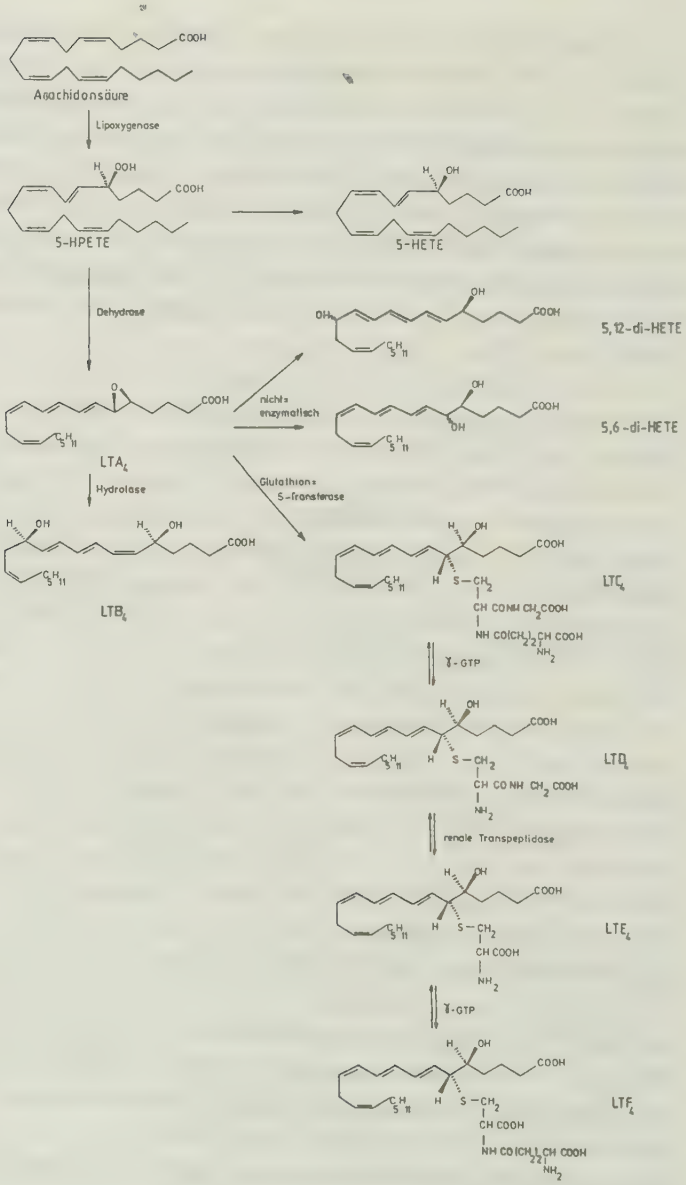


Abb. 2: System der Lipoxygenaseprodukte.

katalytisch in Gang gehalten werden (87 - 91). Somit sind nach heutigem Kenntnisstand die Leukotriene und andere Lipoxygenaseprodukte nicht nur an entzündlichen und allergischen, sondern auch an immunologischen Vorgängen beteiligt (69 - 72, 76, 92 - 95).

Während ein Aspekt der aktuellen Forschung auf dem Gebiet der Entwicklung spezifischer Leukotrien-Inhibitoren im Sinne von Antioxidantien bzw. von Rezeptor-Antagonisten liegt (92, 93, 96, 97), beschäftigen sich andere Arbeiten mit der Beteiligung der Lipoxygenaseprodukte am Vorgang der Transplantatabstoßung, mit dem Stoffwechsel der Leukotriene, mit ihrer exakten Darstellung und Messung (98 - 115).

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Leukotriene B_4 und C_4 (LTB_4, LTC_4) als Modellsubstanzen für die Ausscheidung von Lipoxygenaseprodukten im Urin bei Gesunden und bei Patienten nach Nierentransplantation ausgewählt. Ziel der Arbeit war es, Daten aus dem Zeitraum unmittelbar nach Organverpflanzung und während der nachfolgenden ambulanten Kontrollen zu sammeln und sie Meßergebnissen an nierengesunden Probanden und an Patienten mit stabiler Funktion des Nierentransplantats gegenüber zu stellen.

Analog zu den Kenntnissen, wie sie für Thromboxan vorlagen, sollte dann geprüft werden, ob sich in Verbindung mit der konventionellen Diagnostik der Leukotrienausscheidung ein frühzeitiger Hinweis auf eine Transplantatabstoßung ergab. Weiterhin blieb zu klären, inwieweit die durchgeführten Messungen eine Aussage über die gegenwärtige bzw. zukünftige Organfunktion erlaubten.

Da den präoperativ bestehenden Risiken bzw. Differenzen in der HLA-Typisierung durch Spender und Empfänger mit unterschiedlichen medikamentösen Therapieschemata Rech-

nung getragen wurde, stellte sich zwangsläufig die Frage, ob die Art der Immunsuppression bzw. die Abwendung einer Abstoßungsreaktion durch hochdosierte Glucocorticoidgaben ihren Niederschlag in der Leukotrienausscheidung im Urin fanden.

Um einen Beitrag zur Klärung dieser Thematik liefern zu können, war die Erstellung einer Routinemethodik zur schnellen, reproduzierbaren und schonenden Extraktion und Messung von LTB_4 und LTC_4 aus menschlichem Urin notwendig. Ein weiteres Ziel bestand darin, das Aufarbeitungsverfahren für biologische Proben unterschiedlicher Herkunft und für nicht-biologische Proben zu standardisieren und weitgehend zu automatisieren. Schließlich sollte die Probe in einer Form vorliegen, die den Einsatz von verschiedenen spezifischen und sensitiven Meßverfahren gestattete.

Aufgrund der Empfindlichkeit der Leukotriene gegenüber physikalischen, chemischen und enzymatischen Einflüssen erlangte die Frage nach der Stabilität und dem Metabolismus von LTB_4 und LTC_4 im Rahmen der Probengewinnung, -lagerung und -extraktion eine nicht zu unterschätzende Bedeutung. Darüber hinaus war zu prüfen, ob sich auch stabile Endprodukte des Lipoxygenasestoffwechsels im Urin nachweisen ließen. Dazu wurde ein Modell zur kontrollierten Nachahmung physiologischer Bedingungen entwickelt. Damit war es möglich, die Degradation von LTB_4 und LTC_4 im Urin zu untersuchen.

Als analoge Reaktion auf Entzündungsreize, wie sie der menschliche Körper der Implantation eines fremden Organs entgegensetzt, können chronisch-entzündliche Erkrankungen des Verdauungstraktes (M. Crohn, Colitis ulcerosa) und ihre akuten Exazerbationen verstanden werden. Nicht selten sind sie von inflammatorischen Prozessen aus dem

Bereich der Kollagenosen und der Autoimmunkrankheiten begleitet. Bei verschiedenen dieser Krankheitsbilder wurden hohe Konzentrationen an Leukotrienen und ihrer Vorstufen gefunden (93, 118 - 122).

Diesen Erkrankungen ist gemeinsam, daß ihre Merkmalsträger in einem hohen Prozentsatz einer typischen Histokompatibilitäts-Konstellation angehören, z.B. dem HLA-Typ B 27. Es wird vermutet, daß Lipoxygenaseprodukte bei der lokalen Leukozytenakkumulation am Entzündungsort wesentlich beteiligt sind und daß der Defekt der zellulären Immunität ätiopathogenetisch eine Rolle spielt (123 - 127).

Es lag daher nahe, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und M. Crohn nach pathophysiologischen Veränderungen bei den verschiedenen Arachidonsäure-Metaboliten des Lipoxygenase-Abbauweges zu suchen. Da die direkte Messung der Metabolite in biologischem Material wegen ihrer Labilität und den sehr niedrigen Konzentrationen wenig aussichtsreich erschien und Analysen im Urin nicht das Geschehen am Entzündungsort widerspiegelten, sollte die Lipoxygenaseaktivität direkt in Biopsieproben aus gesunden und erkrankten Abschnitten des Colons untersucht werden. Pathophysiologische Veränderungen bei der Leukotrien- und HETE-Synthese müßten primär an Aktivitätsänderungen dieses Schlüsselenzyms sichtbar werden.

2. Material und Methoden

2.1. Standards und Referenzsubstanzen

2.1.1. Unmarkiertes Material

Die Leukotriene B_4 (LTB_4), C_4 (LTC_4), D_4 (LTD_4) und E_4 (LTE_4) waren ein großzügiges Geschenk von Herrn Dr. J. Rokach, Merck Frosst Canada Inc., ebenso 5-, 12- und 15-Hydroxy-Eicosatetraensäure (5-HETE, 12-HETE, 15-HETE). Prostaglandin B_2 (PGB_2) und Leukotrien F_4 (LTF_4) wurden von Herrn Dr. C.O. Meese vom Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart, synthetisiert. Als Methylester geschütztes Leukotrien A_4 (LTA_4-ME) und D_4 (LTD_4-ME) wurden von der Fa. Paesel in Frankfurt gekauft. Arachidonsäure (AA) stammte von der Fa. Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen bzw. von der Fa. Fluka, Buchs, Schweiz.

2.1.2. Markiertes Material

Alle Leukotriene und Hydroxy-Eicosatetraensäuren wurden als tritiierte Standards von New England Nuclear (NEN) Chemicals GmbH, Dreieich, bezogen, ebenso ^{14}C-markierte Arachidonsäure (^{14}C-AA). Radioaktiv markiertes Leukotrien F_4 (^3H-LTF_4) war derzeit kommerziell nicht erhältlich. Die Fa. Amersham-Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, lieferte tritiiertes Prostaglandin B_2 (^3H-PBG_2).

2.1.3. Aufbewahrung

Aliquots unmarkierter Substanzen wurden bei -80 °C entsprechend den Angaben der Hersteller unter Argon-Atmosphäre in silanisierten Gefäßen aufbewahrt, radioaktive Substanzen hingegen bei -20 °C. Zusammensetzung und Reinheit der Substanzen wurden regelmäßig überprüft (UV-Spektroskopie, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie,

Dünnschicht-Chromatographie), gegebenenfalls erfolgte eine Aufreinigung mit HPLC und TLC (s. Abschnitt 2.7.4. und 2.10.).

2.2. Hilfsmittel

2.2.1. Chemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig, zusammen mit Wellcome Diagnostics, England:	Radioimmunoassay zur Bestimmung von Leukotrien B_4 (Standards und Antikörper).
Boehringer, Mannheim:	Calcium-Ionophore, A 23 187.
Fluka, Neu-Ulm:	Acetonitril, Butylamin, Heptansulfonsäure-Na-Salz-Monohydrat, Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, Tetrabutylammoniumhydrogenchlorid.
Merck, Darmstadt:	Ammoniak 25%, Äthanol absolut, Äther, Äthylacetat, Benzol, Calciumchlorid, Chloroform, Dichlormethan, Dichlormethylsilan, Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, Eisessig, Folin-Reagenz, Glucose, Kupfersulfat, Natriumchlorid, Natriumcarbonat, Natriumdihydrogenphosphat, Salzsäure, Tris(hydroxymethyl)-methylamin, Toluol, Zitronensäure.
MSD, München:	Indomethacin.
Messer, Griesheim:	Oxisorb-Patronen zum Anschluß an Argon 4.8-Flasche.
NEN Chemicals, Dreieich:	Radioimmunoassay zur Messung von Leukotrien C_4 (Standards, Tracer, Antikörper, Assay-Puffer, Aktiv-Kohle).
Pharmacia, Freiburg:	Dextran T 70.
Promochem, Wesel:	Methanol ChromAR HPLC.

Serva, Heidelberg:	Aktivkohle Norit A.
Sigma, Taufkirchen:	Gelatine.

2.2.2. Geräte und Materialien

Baker, Groß-Gerau:	Baker-10-SPE-Vakuumextraktionssystem; Silica-Einmaltrennsäulen mit C_{18}-Festphase, 6 ml Füllinhalt.
Beckman-Instruments, München:	Spektralphotometer Acta V; Ultrazentrifuge L 5 - 65; Einkanal-Festwellen-Detektor 160; variabler, programmierbarer Mehrkanal-Detektor 165; HPLC-Trennsäule mit Ultrasphere C_{18}, 5 µm Partikelgröße.
Berthold, Wildbad:	Beta-Counter LSC BF 5000/300; Dünnschicht-Chromatographie-Scanner II LB 2723 und Verstärker LB 241 K.
Bischoff, Leonberg:	HPLC-Säulenfüllmaterial Spherisorb Cyano, 5 µm; Spherisorb ODS II, 5 µm; Spherisorb ODS I, 10 µm (alle Phase Separation England); Hypersil ODS, 5 µm (Shandon, England); Manufit-System für Vorsäulen-Kartuschen; HPLC-Leersäulen NC, 250 mm und 125 mm Länge, 4,6 mm Durchmesser.
Büchi, Eislingen:	Rotationsverdampfer RE.
Hamilton, Bonaduz, Schweiz:	Präzisionsspritzen 10 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl und 500 µl.
Hewlett-Packard, Böblingen:	HP 67 Taschenrechner HP 9830 A Tischrechner mit Plotter HP 5985 Quadrupol Massenspektrometer (GC-MS) Silica-Kapillarsäule SE-30 GCMS.
Instrumentation Specialties Co., Lincoln, Nebraska:	Fraktionssammler ISCO 328.

Macherey und Nagel, Düren:	HPLC-Säulenfüllmaterial Nucleosil C_{18}, 5 µm und Polygosil C_{18}, 5 µm.
MSE Measuring and Scientific Equipment, Ltd., Sussex, England:	Zentrifuge MSE Mistral GL.
Merck, Darmstadt:	HPLC-Säulenfüllmaterial Lichrosorb C_{18}, 5 µm.
Nuclear Chicago:	Beta-Counter Mark II.
Schleicher und Schüll, Dassel:	Membranfilter RC 55, 0,45 µm Porenweite.
Waters/Millipore, Eschborn(Frankfurt):	Einmal-Extraktions-Kartuschen Silica- und C_{18}-SepPak; HPLC-Pumpen M 6000 A; Automatisches Gradienten-Kontrollsystem M 680; Automatischer Probeninjektor WISP 710 B; Dreiwegeventil für die HPLC-Fraktionierung; Säulenfüllmaterial µ-Bondapak C_{18}.
Whatman Inc., Clifton, N.J., USA:	Dünnschicht-Chromatographie-Platten LK 5 F, 20 cm x 20 cm.
Zinsser-Analytik, Frankfurt:	Wheaton-Spitzboden-Gefäße mit Schraubdeckel und Teflonmembran à 200 µl und à 1 ml; Autosampler-Gefäße à 5 ml und à 8 ml; Glasreaktionsgefäße mit Schraubdeckel und Teflonmembran à 4 ml und à 8 ml; Szintillator Quickszint 212; Szintillationsgefäße "minivials 88" à 5 ml und "polyvials 714" à 20 ml.

2.3. Urinproben zur Untersuchung auf LTB_4 und LTC_4

2.3.1. Zusammensetzung der Versuchsgruppen

An der Studie nahmen 10 nierengesunde Freiwillige (Kontrollgruppe), 12 Patienten aus der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen (Patienten in der akuten Phase nach Nierentransplantation) und 28 Patienten aus der Nephrologischen Ambulanz des Katharinen-Hospitals in Stuttgart (Patienten in der chronischen Phase nach Nierentransplantation) teil.

2.3.2. Kontrollgruppe

An drei aufeinander folgenden Tagen wurde bei 5 Frauen und 5 Männern im Alter von 24 bis 35 Jahren (Raucher und Nichtraucher) Spontanurin gesammelt und die Menge des 24-Stunden-Urins bestimmt. Weder vor noch während des Untersuchungszeitraumes nahmen die Probanden Medikamente ein.

Chronische oder akute Erkrankungen bestanden nicht. Semiquantitative Untersuchungen des Urins mit Teststäbchen und die mikroskopische Analyse des Sediments ergaben keine pathologischen Befunde. Die Urine waren kulturell keimfrei. Sämtliche Werte des Routinelabors (rotes und weißes Blutbild, Elektrolyte, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, Serumkreatinin, Serumharnsäure, Transaminasen, Phosphatasen, Laktatdehydrogenase, plasmatische Gerinnung) lagen im Normbereich.

Mit Hilfe von statistischen Verfahren (siehe Ergebnisteil) wurde die Homogenität der Kontrollgruppe überprüft. Die wiederholten Probeentnahmen im engen zeitlichen Zusammenhang sollten Aussagen über Schwankungen in der täglichen Urinausscheidung von LTB_4 und LTC_4,

über die Präzion der Probenaufarbeitung und -messung sowie über eine geschlechts- oder altersspezifische Verteilung der Meßwerte zulassen. Insgesamt wurden 60 Urinproben aus dieser Gruppe bearbeitet.

2.3.3. Akutphase nach Nierentransplantation

Bei 12 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unterschiedlicher Genese (3 Frauen und 9 Männer) im Alter zwischen 19 und 57 Jahren wurde täglich der postoperative stationäre Verlauf der Urinausscheidung von LTB_4 und LTC_4 nach Transplantation einer Leichenniere bis zur erstmaligen Entlassung in eine engmaschige ambulante Betreuung verfolgt.

Aus der Vielzahl der klinisch-chemisch erfaßten Parameter wurden zur Korrelation mit den eigenen Ergebnissen der Urinanalyse auf LTB_4 und LTC_4 vor allem Daten herangezogen, mit deren Hilfe die Transplantatfunktion kontrolliert und anhand derer eine mögliche Abstoßungsreaktion diagnostiziert wurde (tägliche Urinmenge, Urinelektrolyte, Osmolarität, Eiweiß; Serumkreatinin und -harnstoff, endogene Kreatinin-Clearence; Ultraschall, Isotopennephrogramm; Blutbild). Die Standardmedikation nach dem Therapieschema mit Azathioprin bzw. Ciclosporin A und therapeutische Maßnahmen bei drohender Transplantatabstoßung wurden aufgezeichnet.

Über die Akutphase hinaus standen noch die Funktionswerte der ambulanten Untersuchungen zur Verfügung. Ein Teil der Patienten mußte innerhalb kurzer Zeit einmal oder mehrfach zur Behandlung einer Abstoßungsreaktion erneut stationär aufgenommen werden. Diese Daten wurden in die Gesamtbeurteilung eines jeden Patienten mit einbezogen. Für diesen anschließenden Zeitraum konnten keine

Urinproben mehr gesammelt werden. Aus der Akutphase wurden über 350 Urine analysiert.

Soweit erhebbar, wurden die Anamnese vor der Nierentransplantation, begleitende Erkrankungen, Risikofaktoren sowie Informationen über den Organspender in die Auswertung mit einbezogen. Weiterhin fanden das Ergebnis der HLA-Typisierung von Spender und Empfänger, Bluttransfusionen, die Beschreibung der Transplantat-Sofortfunktion sowie intra- und postoperative Komplikationen Erwähnung.

2.3.4. Chronische Phase nach Nierentransplantation

Diese Gruppe setzte sich aus 10 Frauen und 18 Männern im Alter von 11 bis 62 Jahren zusammen. Der Zeitpunkt der Organverpflanzung lag wenigstens 6 Monate und längstens 10 Jahre zurück. Zwei Patienten waren bereits zum zweiten Mal transplantiert worden.Jeder Patient lieferte anläßlich einer Kontrolluntersuchung in der Nephrologischen Ambulanz eine Probe seines Spontanurins und einen 24-Stunden-Urin ab. Es wurden insgesamt 56 Urinproben aufgearbeitet und analysiert.

Stets wurde eine Zwischenanamnese einschließlich der Erstellung eines körperlichen Befundes erhoben. Dazu gehörten Basiswerte wie Gewicht, Körpertemperatur und Blutdruck. Analog zu den Mitgliedern der beiden anderen Gruppen wurden Blutuntersuchungen durchgeführt, so daß auch hier ein umfangreiches Datenmaterial für eine vergleichende Bewertung der Patienten in der chronischen Phase nach Nierentransplantation untereinander sowie zusätzlich mit den Normalprobanden und den Patienten in der akuten Phase nach Nierentransplantation zur Verfügung stand. Die chronologisch geführten Aufzeichnungen ließen in Relation zu den aktuellen Werten eine Verlaufs-

betrachtung zu, die durch die Anpassung der immunsuppressiven Medikation ergänzt wurde . In die Studie wurden nur Patienten mit zum Untersuchungszeitpunkt stabiler Transplantatfunktion einbezogen.

Weitere wichtige Merkmale zur Charakterisierung der Patienten in der chronischen Phase nach Nierentransplantation waren die Art der Grunderkrankung, die zur Niereninsuffizienz geführt hatte, die Dauer der Dialyse und die Transplantatüberlebenszeit. Daten zur Herkunft des Spenderorgans, zur HLA-Typisierung und zur postoperativen Rehabilitation lagen nur in wenigen Fällen vor, so daß auf ihre Erhebung verzichtet wurde.

2.3.5. Transport und Lagerung der Urinproben

Wegen der bekannten Instabilität der zu messenden Substanzen kam der Sammlung und Aufbewahrung der Urinproben besondere Bedeutung zu. Um die enzymatische und nichtenzymatische Degradation von vornherein weitgehend auszuschließen, wurden jeweils 50 ml Spontanurin sofort mit einer 3-fachen Menge an eiskaltem absoluten Äthanol gefällt und in luftdicht verschließbaren Flaschen aus Braunglas unter Argon-Atmosphäre aufbewahrt. Der Transport der Proben erfolgte in Styroporcontainern auf Trockeneis, die Lagerung bis zur Aufarbeitung und Analyse bei -20 ^{o}C.

2.4. Biopsieproben zur Untersuchung der Lipoxygenaseaktivität bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Enddarms

2.4.1. Untersuchte Patienten

Insgesamt wurden von 45 Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Colons Biopsieproben aufgearbeitet. Die folgende Auswertung bezieht sich jedoch nur auf jene 12 Patienten, bei denen es möglich war gleichzeitig sowohl aus entzündetem wie auch aus gesundem Gewebe Biopsieproben zu entnehmen. Bei diesem intraindividuellen Vergleich war also jeder Patient seine eigene Kontrolle und das "interne cross-over" gestattete somit eine direkte Aussage, ob Leukotriene bzw. Monohydroxy-Eicosatetraensäuren (HETEs) am lokalen Entzündungsgeschehen des Enddarms beteiligt waren. Sämtliches Biopsiematerial stammte aus der Gastroenterologischen Abteilung der Medizinischen Klinik in Stuttgart-Bad Cannstadt.

2.4.2. Transport und Lagerung der Biopsieproben

Die Biopsieproben aus entzündeter und gesunder Colonmukosa (ca. 20 mg Feuchtgewicht) wurden jeweils getrennt sofort nach der Entnahme in 2,5 ml 50 mM Trispuffer (pH 7,4) tiefgefroren und bis zur Aufarbeitung bei einer Temperatur von -80 ^{o}C gelagert. Der Transport erfolgte auf Trockeneis in Styroporcontainern.

2.5. Extraktion von LTB_4 und LTC_4 aus Urin

Aliquots von Urinproben (jeweils Doppelansätze aus 10 ml Urin mit 30 ml Äthanol gefällt) wurden in Glas-Zentrifugeneinsätzen 30 Minuten lang bei 3000 g, 0 °C und unter Argon-Atmosphäre zentrifugiert. Der Überstand wurde am Rotationsverdampfer lichtgeschützt bei einer Wasserbadtemperatur von nicht mehr als 30 °C innerhalb von 30 bis 45 Minuten am Hochvakuum (ca. 10 mTorr) zur Trockne eingeengt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C und unter Argon in 5 ml Calcium- und Magnesium-freiem 10 mM Phosphatpuffer pH 5,0 mit 0,9% Kochsalz aufgenommen.

An die Eiweißfällung schloß sich eine Extraktion mit ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen (6 ml, 500 mg Füllgewicht) an, auf die die Proben mittels 2 x 5 ml des oben genannten Phosphatpuffers aufgetragen wurden. Die C_{18}-Trennsäulen wurden vorher mit 5 ml Methanol und 20 ml Phosphatpuffer pH 5,0 konditioniert. Bis zur Adsorption der Leukotriene an die ODS-Festphase war darauf zu achten, daß der während der Konditionierung aufgetragene Oberflächenfilm erhalten blieb (108).

Die gleichzeitige Bearbeitung von 10 Urinproben war mit dem Baker-10-SPE-Vakuumextraktionssystem möglich, das über eine Woulfe'sche Flasche an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war.

Salze und extrem polare Probenbestandteile wurden mit 3 x 5 ml destilliertem Wasser ausgewaschen. In einem weiteren Vorreinigungsschritt wurden Urinfarbstoffe mit 3 x 1 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 v/v/v pH 5,0 und 1 mM Butylamin als Zusatz abgetrennt. Die gesuchten Leukotriene wurden mit 4 x 5 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 v/v/v pH 8,0 (mit 25%-iger Ammoniak-Lösung) eluiert, im Stickstoffstrom zur Trock-

ne eingeengt und in 200 µl Laufmittel für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgenommen.

2.6. Aufarbeitung der Biopsieproben

Nach dem Auftauen wurden die Biopsieproben in 2,5 ml 50 mM Tris-Puffer fünf Minuten lang bei 0 °C mit einem Potter homogenisiert. Daran schloß sich eine einstündige Zentrifugation des Homogenisats bei 100 000 g mit freiem Auslauf des Rotors an.

Aliquots des Überstandes (1 ml), welche die lösliche Lipoxygenase enthielten, wurden für die verschiedenen Inkubationsansätze abgemessen, in denen die Aktivität des Enzyms anhand des Umsatzes von ^{14}C-markierter und/oder unmarkierter Arachidonsäure bestimmt wurde. Ein weiterer Teil des 100 000 g - Überstandes wurde zur Proteinbestimmung (Methode noch Lowry) verwandt, um die Enzymaktivität bezogen auf den Proteingehalt ausdrücken zu können. In der Regel wurden 55 - 780 µg Protein/ml für eine Inkubation eingesetzt.

2.6.1. Proteinbestimmung im Überstand

Es wurde eine modifizierte Lowry-Methode verwendet, bei der 0,1 ml des 100 000 g - Überstandes mit 0,7 ml 10%iger Na_2CO_3-Lösung und mit 0,1 ml 0,1%iger $CuSO_4$-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Zusatz von 0,1 ml Folin-Reagenz (1:3 verdünnt) wurde die Probe weitere 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Probe auf Raumtemperatur gebracht und nach 15 Minuten die Extink-

tion bei 750 nm gemessen. Mit Rinderserumalbumin (RSA) wurde eine Eichkurve zwischen 0 und 100 µg/ml aufgenommen. Die Proteinkonzentration in der Probe in Relation zur umgesetzten Menge an Substrat wurde als spezifische Aktivität durch:

$$\frac{\text{pmol Substratumsatz}}{\text{µg Protein x min.}}$$

ausgedrückt.

2.6.2. In vitro-Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität

In der Tabelle 1 sind die Komponenten des Inkubationsansatzes zur Messung der Lipoxygenaseaktivität im 100 000 g - Überstand von Darmbiopsieproben zusammengestellt. Glucose ist der Energielieferant der Umsetzung. Mit Hilfe des Calcium-Ionophores A 23 187 wurden Ca^{2+}-Ionen zur Katalyse der Lipoxygenasereaktion herangeführt. Indomethacin blockierte die Stoffwechselwege der Prostaglandin- und der Thromboxan-Synthese.

Falls ein Testparameter geändert wurde (z.B. keine markierte Arachidonsäure beim Ansatz für den Radioimmunoassay), wurde die Volumenänderung durch Trispuffer ausgeglichen, so daß der Inkubationsansatz stets 2 ml betrug. Die Inkubationszeit des 100 000 g - Überstandes betrug 10 Minuten bei 37 °C.

2.6.3. Extraktion der Lipoxygenaseprodukte

Am Ende der Inkubationszeit wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt und durch Absenken des pH-Wertes auf 3,5 mit 2,3 M Zitronensäure die Enzymreaktion endgültig beendet. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität in der Probe wurden vor Beginn der Extraktion zwei Aliquots à 20 µl entnommen.

Tab. 1: Bestandteile des optimierten Inkubationsansatzes zur Messung der Lipoxygenaseaktivität im 100 000 g - Überstand von Darmbiopsieproben (Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C, Lichtschutz).

Bestandteile des Ansatzes / Meßmethode	Dünnschicht-chromatographie	Hochdruck-flüssigkeits-chromatographie	Radio-immuno-assay
100 000 g - Überstand	1 ml	1 ml	1 ml
5o mM Trispuffer pH 7,4	0,3 ml	0,3 ml	0,4 ml
Glucose (1 mg/ml)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
1 mM $CaCl_2$	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
2 µM Ca-Ionophore A 23 187	0.1 ml	0,1 ml	0,1 ml
0,1 M Natriumchlorid	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
1,4 µM Indomethacin	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
^{14}C-Arachidonsäure (ca. 400 000 cpm/0,1 ml)	0,1 ml	0,1 ml	-
10 µM Arachidonsäure	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Im Sauren folgte nun eine Zweiphasen-Flüssig-Extraktion zwischen Dichlormethan (5 ml) und dem Inkubationspuffer (2 ml). Dabei wurde das Gemisch 10 Minuten lang lichtgeschützt bei 4 °C geschüttelt und anschließend mit ca. 1 000 g zur besseren Phasentrennung 5 Minuten lang zentrifugiert. Die obere Phase (Puffergemisch) wurde abgehoben und ein weiteres Mal mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Anschließend wurden sowohl in der organischen als auch in der wäßrigen Phase die jeweiligen Aktivitäten an ^{14}C-markierter Arachidonsäure und der daraus entstandenen radioaktiven Metabolite durch Flüssig-Szintillations-Messung bestimmt (Recovery).

Die vereinigten Dichlormethan-Phasen wurden unter Stickstoff zur Trockne eingeengt und in den Laufmitteln bzw. den Puffern des jeweiligen Meßverfahrens augenommen (Dünnschichtchromatographie: 2 x 50 µl Äthanol, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie: 2 x 100 µl Methanol/H_2O/Essigsäure 70/30/0,1 v/v/v pH 5,0 mit 2 mM Butylamin, Radioimmunoassay: 2 x 50 µl Assay-Puffer für LTB_4- bzw. LTC_4-RIA). Die Messung und Auswertung der Proben erfolgte wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

2.7. Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Zur isokratischen und Gradientensteuerung von zwei pulsationsarmen Doppelkolbenpumpen diente ein automatisches Gradientenkontrollgerät. Ein programmierbares Autoinjektionssystem übernahm die Abarbeitung der Proben im Probenkarussell. Die Elution der Substanzen wurde photometrisch im UV je nach Fragestellung bei 280 nm und/oder 235 nm verfolgt und kontinuierlich registriert. Zusätzlich konnten wahlweise weitere Chromatographiebedingungen wie Förderrate der Pumpen, Druck- und Gradientenverlauf, etc. aufgezeichnet werden. Ein Blockschaltbild der Gesamtanlage ist in Abb. 3 dargestellt.

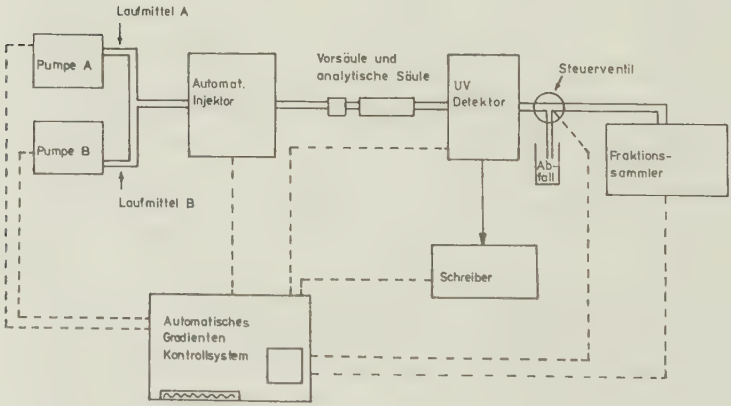


Abb. 3: Aufbau des automatisierten HPLC-Systems.

Kernstück des HPLC-Systems war eine analytische HPLC-Säule NC (250 mm x 4,6 I.D.), gepackt mit Sperisorb ODS II, Partikelgröße 5 µm, für die Reverse Phase-Chromatographie von Lipoxygenaseprodukten. Es handelte sich dabei um hochgradig nachsilanisiertes, sphärisches Material mit extremem Reverse Phase-Charakter. Im Gegensatz zu anderen C_{18}-Ma-

terialien (Shandon, Nucleosil, Polygosil, Ultrasphere, µ-Bondapak, LiChrosorb) waren bei Verwendung von Spherisorb ODS II keine "Aufsättigung" der Säule mit einigen Mikrogramm authentischer Standard-Substanzen und nur in Ausnahmefällen der Zusatz von Laufmitteladditiven (tertiäre Amine, Chelatbildner) zur Verbesserung der Trennleistung notwendig. Zum Schutz der Hauptsäule dienten in Form von austauschbaren Kartuschen (Manufit-System) Vorsäulen (20 mm x 4,6 mm I.D.) mit Sperisorb ODS I, 10 µm oder Spherisorb ODS II, 5 µm. Durch unmittelbare Ankopplung an die Hauptsäule wurde eine Antrennung in Form von Doppelpeaks oder Schultern vermieden.

Fraktionen mit radioaktiv markierten Substanzen bzw. Abschnitte aus Chromatogrammen zur automatisierten Probenaufarbeitung wurden mit einem Fraktionssammler über ein Dreiwege-Ventil abgetrennt. Ein Aufsatz aus Aluminiumfolie gestattete es, bereits fraktionierte Proben ständig unter Argon-Atmosphäre vor Licht und Luftsauerstoff zu schützen.

2.7.1. HPLC-System für die anschließende radioimmunologische Bestimmung von LTB_4 und LTC_4 aus Urinproben

Aus zahlreichen Trennversuchen erwies sich ein Gradientensystem mit den Laufmitteln:

A: Methanol/Wasser/Essigsäure 60/40/0,1 v/v/v pH 6,8

und

B: Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 v/v/v pH 6,8

als optimal. Der pH-Wert wurde mit 25%iger Ammoniak-Lösung eingestellt. Sämtliche Laufmittel wurden nach Filtration unter Wasserstrahlpumpenvakuum im Ultraschall-Bad entgast. Dies diente zum einen dem Schutz der Leukotriene vor chemischer Oxidation und der Sicherung des störungsfreien Dauerbetriebs des HPLC-Systems. Eine Zusammenfassung des Gradientenablaufs und der wesentlichen Steuerfunktionen

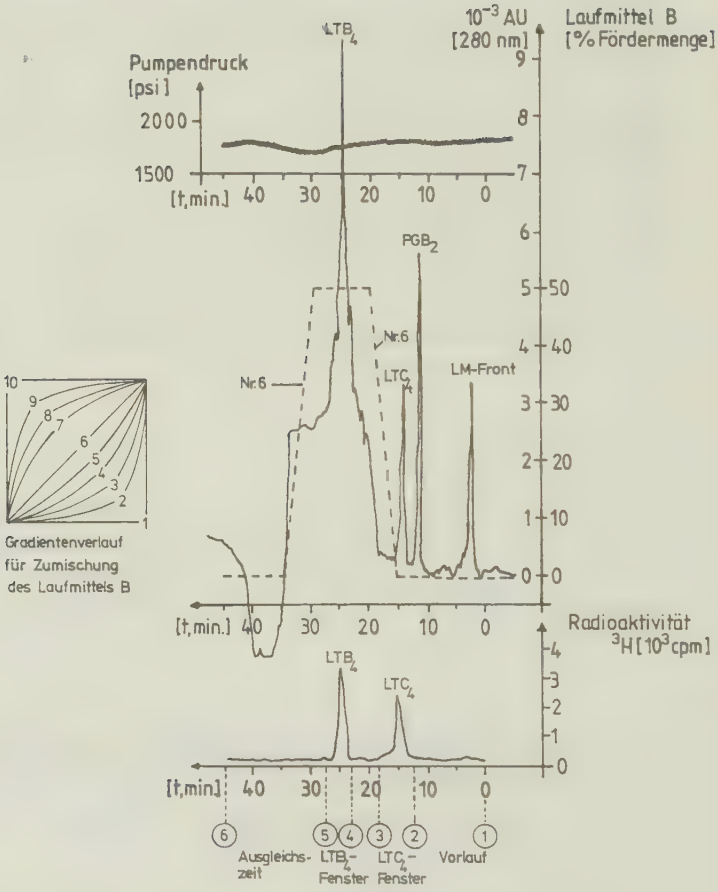


Abb. 4: Chromatogramm und Steuerbefehle zur Abtrennung von PGB_2, LTB_4 und LTC_4 aus Urin für spezifische Radioimmunoassays.
Laufmittel A: Methanol/Wasser/Essigsäure 60/40/0,1 v/v/v pH 6,8
Laufmittel B: Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 v/v/v pH 6,8.
UV (λ = 280 nm und 0,01 AU Empfindlichkeit).
Gradient, Druckaufzeichnung, Radioaktivität und Steuerimpulse.
Säule: Spherisorb ODS II, 5 µm.

des Elutionsprogramms liefert Abb. 4.

Gegenüber dem UV-Signal wurden die radioaktiv markierten Fraktionen mit einer Verzögerung von 1 Minute gesammelt (Weg der Probe zwischen Detektorzelle und Fraktionssammler). Die Einstellung der Fenster, innerhalb derer LTB_4 und LTC_4 eluierten, wurden wiederholt mit markiertem und unmarkiertem Material bestimmt und gegebenenfalls korrigiert.

Der Viskositätsunterschied zwischen Laufmittel A und B wurde durch den Kompressibilitätsfaktor f berücksichtigt, so daß der systemische Druck im Verlauf des Gradienten nur geringfügig schwankte:

$$f = \left(\frac{\text{Zeit}}{\frac{\text{Volumen}}{\text{Flußrate}}} - 1 \right) \times 100 \times \frac{6\,000 \text{ psi}}{\text{aktueller Druck (psi)}} \quad (1)$$

Das automatische Gradienten-Kontrollgerät kompensierte die Flußrate nach:

$$F = F_o \left(100 + f \times \frac{\text{aktueller Druck (psi)}}{6\,000 \text{ psi}} \right) \quad (2)$$

F: tatsächliche Flußrate

F_o: Flußrate ohne Kompensation

f: Kompressibilitätsfaktor aus (1)

2.7.2. HPLC-System für die Fraktionierung von Lipoxygenaseprodukten aus Inkubationsansätzen von Biopsieproben mit ^{14}C-markierter und unmarkierter Arachidonsäure

Dieses System benutzte die Laufmittel

A: Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/0,1 v/v/v. pH 5,0, mit 2 mM Butylamin.

B: Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 v/v/v pH 6,8, kein Butylamin.

Die Gradientensteuerung zur Trennung von Leukotrienen, Monohydroxy-Eicosatetraensäuren und Arachidonsäure bestand aus einem isokratischen Abschnitt zu Beginn des Chromatogramms, einem 30-minütigen Anstieg auf 50 % Zumischung von Laufmittel B und einer schnellen Umstellung auf 100 % Laufmittel B, verbunden mit einer Zunahme der Flußrate von 1,0 ml (bis 45 Minuten) auf 1,5 ml (bei 50 Minuten). Diese Bedingungen wurden 20 Minuten lang beibehalten. Innerhalb von 5 Minuten wurde der Gradient auf die Ausgangsbedingungen zurückgefahren und die Trennsäule anschließend hinreichend äquilibriert (Abb. 5).

Mit Hilfe dieses Gradienten konnten Substanzen, die sich in ihrer Polarität deutlich unterschieden, in einem Lauf getrennt werden. Dieses Chromatographiesystem wurde hauptsächlich eingesetzt, um die Produkte des Enzyms Lipoxygenase aus Biopsieproben von Patienten mit entzündlichen Enddarmerkrankungen zu bestimmen. Andere Anwendungsbereiche waren die Aufreinigung von Standards.

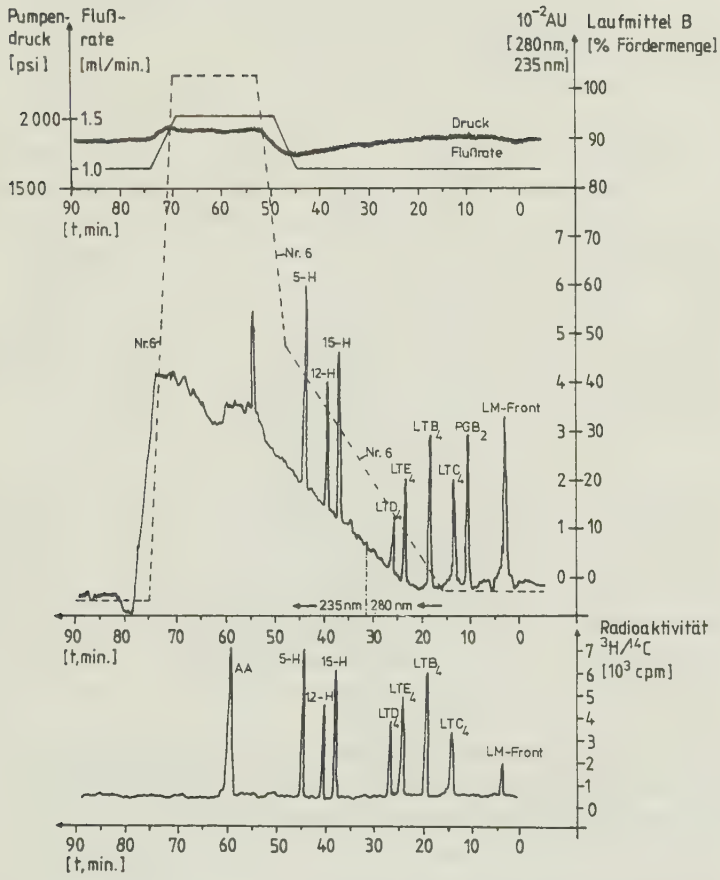


Abb. 5: Gradientenprogramm zur kontinuierlichen Fraktionierung von Lipoxygenaseprodukten aus Biopsieproben.

Laufmittel A: Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/0,1 v/v/v pH 5,0 mit 2 mM Butylamin.

Laufmittel B: Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 v/v/v pH 6,8 mit 25% Ammoniak.

UV (λ = 280 nm und 235 nm, 0,1 AU Empfindlichkeit).

Gradient, Druckaufzeichnung, Flußrate, Radioaktivität.

Säule: Sperisorb ODS II, 5 µm.

2.7.3. HPLC-System zur Untersuchung des Metabolismus von Leukotrienen im Urin

Bei dem oben beschriebenen Verfahren diente die UV-Detektion dazu, den Chromatogrammablauf und die Effizienz der Probenextraktion zu verfolgen, da bei einem Gradientenprogramm mit zusätzlicher pH-Wertänderung des Laufmittels die Grundliniendrift eine sinnvolle Peakintegration nicht zuließ. Deshalb wurde ein isokratisches System zur Auftrennung und photometrischen Identifikation von PGB_2 (interner Standard), LTB_4 und allen Sulfidopeptid-Leukotrienen (LTC_4, LTD_4 und LTE_4) geschaffen. Zusätzlich zur Radioaktivität pro Minutenfraktion wurde die Integration der Peakflächen durchgeführt.

Das Laufmittel A der Zusammensetzung Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/0,1 pH 5,0 (mit 96% Essigsäure) enthielt einen Zusatz von 2 mM Butylamin. Damit war eine Basislinien-Trennung von PGB_2, LTC_4, B_4, E_4 und D_4 (in der Reihenfolge der Elution), mit Spherisorb ODS II, 5 µm (Vorsäule 20 mm x 4,6 mm I.D., Hauptsäule 250 mm x 4,6 mm I.D.) innerhalb von 30 Minuten möglich (Abb. 6).

Die Steuerung der Peripheriegeräte zur automatischen Fraktionierung und die Markierung des Chromatogrammablaufs erfolgten analog zu den vorausgehenden Abschnitten. Die Nachweisgrenzen für Reinsubstanzen lagen bei diesem Trennsystem für PGB_2 und LTB_4 bei 500 pg, für die Sulfidopeptid-Leukotriene bei 1 - 2 ng. Andere Autoren haben mit den sogenannten "Normalbore" Säulen ähnliche Resultate erzielt (128 -130), dabei konnten aber z.B. LTD_4 und einige nichtenzymatisch entstandene di-HETES nicht voneinander getrennt werden (128). Mit den "µ-bore"-Methoden ist eine Steigerung der Detektionsgrenze um das 3 - 3,5-fache möglich, so daß z.B. auch Prostaglandine im UV bei 190 nm in einer Menge um 250 pg erfaßt werden konnten (131). Je nach Laufmittel und Säulenmaterial änderte sich aller-

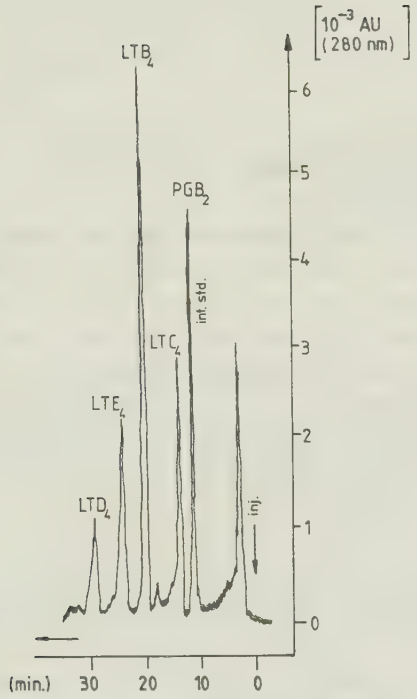


Abb 6: Isokratische Elution von PGB_2 (interner Standard), LTC_4, LTB_4, LTE_4 und LTD_4.
Laufmittel: Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/0,1 v/v/v pH 5,0 mit 2 mM Butylamin.
UV (λ = 280 nm, 0,01 AU Empfindlichkeit).
Säule: Spherisorb ODS II, 5 µm.

dings die Reihenfolge der Elution von Leukotrienen und Prostaglandinen (128). Wurde biologisches Material (Urin) bearbeitet, folgte nach Abschluß des Standardchromatogramms zur Reinigung der Säule ein Gradientenlauf mit 50% Laufmittel B Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 v/v/v pH 5,8 (mit 25% Ammoniak) und Zusatz von 2 mM Butylamin über 30 Minuten. Die anschließende Äquili-

brierungszeit mit Laufmittel A bis zur exakten Einstellung der Ausgangsbedingungen (UV-Absorption, pH-Messung im Säuleneluat) betrug 1 Stunde.

2.7.4. HPLC-Systeme zur Aufreinigung von markierten Standards

Da die Lipoxygenaseprodukte der Arachidonsäure in unterschiedlichem Maße instabil sind, war eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Aufreinigung vor deren Einsatz als Standardsubstanzen für Radioimmunoassays, für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie, für die UV-Spektroskopie und nicht zuletzt als "Markierung" (Spike) in biologischen Proben zur Darstellung von chemischen und enzymatischen Degradationsvorgängen nicht zu umgehen.

Für die Leukotriene wurde ein isokratisches System mit der Zusammensetzung Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 v/v/v pH 5,8 (mit 25% Ammoniak) benutzt. Monohydroxy-Eicosatetraensäuren (5-HETE, 12-HETE und 15-HETE) eluierten bei einem Methanolgehalt von 75%, Arachidonsäure bei einem Methanolgehalt von 85%. Ein Zusatz von Butylamin war bei einfachen Trennungen nicht erforderlich.

2.8. Probenvorbereitung für anschließende Meßmethoden

Die durch HPLC gewonnenen Fraktionen der Leukotriene wurden unter Stickstoff (organischer Laufmittelanteil) und anschließend im Vakuumofen (wäßriger Laufmittelanteil) am Ölpumpenvakuum zur Trockne eingeengt, mit einem Gemisch aus Methanol und Wasser (80/20 v/v) in die entsprechenden Probengefäße überführt und erneut unter Stickstoff zur Trockne eingeengt.

2.8.1. Proben für die Radioimmunoassays

Die Proben zur radioimmunologischen Bestimmung von LTC_4 und LTB_4 im Urin wurden in jeweils 50 µl Assay-Puffer (LTC_4-RIA: 0,9% Kochsalz, 0,1% Gelatine, 10 mM EDTA und 0,1% Natriumazid in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4; LTB_4-RIA: 0,1% Gelatine in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,6) in Eppendorfreaktionsgefäßen aufgenommen und unter Argon-Atmosphäre bei -80 °C aufbewahrt.

2.8.2. Proben für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Proben zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchung wurden in silanisierte Reaktionsgefäße überführt, unter Lichtschutz mit Stickstoff eingeengt und in exakt 1 ml Methanol/Wasser 80/20 v/v unter Argon-Atmosphäre bei -80 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate nach Probenaufarbeitung wurden Aliquots der Proben entnommen (z.B. 2 x 20 µl aus 1 ml mit Hamilton-Spritzen) und die Aktivität des mitgeführten radioaktiv markierten Materials im Flüssig-Szintillations-Zähler gemessen (siehe auch 2.8.3.).

2.8.3. Proben für die Flüssig-Szintillations-Messung (β-Counting)

Ein-Minuten-Fraktionen (1ml) aus Chromatogrammen radioaktiv markierter Proben wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers direkt in kleinen Zählflaschen aufgefangen und unter Zusatz von 3 ml Toluol-Szintillator im Flüssig-Szintillationszähler ausgewertet. Diese Ergebnisse wurden in das UV-Chromatogramm als cpm pro 1 ml-Fraktion eingetragen (131). Aliquots von Proben mit kleinen Volumina (10 bis 50 µl) wurden zur Bestimmung der Recovery mit 1 ml Methanol-Wasser-Gemisch 80/20 v/v versetzt (chemischer Quench) und weiter wie oben ausgewertet.

HPLC-Fraktionen und Proben mit Volumina von mehr als 1 ml wurden in normalen Zählgefäßen unter Zusatz von 10 bis 15 ml Toluol-Szintillator vier Minuten lang gezählt (^{3}H, ^{14}C, ^{3}H- und ^{14}C-Ratio, externer Standard).

2.8.4. Proben für die Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die Auftragung von Proben für die Dünnschichtchromatographie erforderte sehr kleine Volumina. Nach dem Einengen unter Stickstoff im Anschluß an die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden die Proben mit 2 x 100 µl Äthanol aufgenommen. Mit Hilfe von graduierten Kapillaren oder Hamilton-Spritzen wurden die Proben dann auf die Konzentrierungszone von Dünnschichtplatten aufgetragen.

2.8.5. Proben für die UV-Spektroskopie

Da die UV-Grenze (Wellenlänge, bei der die Extinktion des reinen Lösungsmittels, mit 1 cm Schichttiefe gegen Luft gemessen, 1 ist) für reines Methanol bzw. Acetonitril HPLC Grade 205 nm bzw. 190 nm beträgt, wurden die

entsprechenden Proben, in der Regel Standardsubstanzen, nach dem Einengen in exakt 1 ml Lösungsmittel aufgenommen und in Halbmikroküvetten aus Quarzglas spektrometrisch vermessen.

2.8.6. Zubereitung von standardisierten Substanzen

Aufgereinigte unmarkierte Referenzsubstanzen wurden ebenfalls unter Lichtschutz im Stickstoffstrom eingeengt, in Spitzbodenreaktionsgefäße überführt, erneut eingeengt und in exakt 1 ml Methanol oder Acetonitril HPLC Grade aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Absorption im UV-Spektrum und des molaren Extinktionskoeffizienten ε (siehe Abschnitt 2.11.). Im Anschluß an die Messung wurde die Probe erneut eingeengt und in einem geeigneten Volumen an Laufmittel für die HPLC oder in Puffer aufgenommen.

Aliquots radioaktiv markierter Substanzen oder Tracer für die beiden Radioimmunoassys wurden nach der Aufreinigung im β-Counter gezählt und die gewünschte Aktivität pro Volumeneinheit mit Laufmittel, Wasser oder Assay-Puffer eingestellt. Wiederholte Reinjektion der Standards in die HPLC zeigten die Qualität der Aufreinigung an, gaben Aufschluß über die momentane Recovery der HPLC-Säule und warnten zugleich vor der Verwendung von Material, das durch Auto-Degradation verunreinigt war (Stabilitätsprüfung).

2.9. Radioimmunoassays zur Messung der Leukotriene B_4 und C_4

In Abänderung zu den Datenblättern der Testvorschriften ergab sich für die beiden Radioimmunoassays folgendes Versuchsprotokoll:

1) Proben bzw. Standards: in 50 µl Assay-Puffer/Test.
2) Bereich der Standardkurve:
   LTB_4: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 und 1000 pg/Test,
   LTC_4: 25, 50, 100, 200, 400, 800 und 1600 pg/Test.
3) Tracer: 2 000 cpm ^{3}H-LTB_4 bzw. ^{3}H-LTC_4 pro Test, aufgereinigt, in 50 µl Assay-Puffer.
4) Antikörper: in 50 µl Assay-Puffer.
5) Aktivkohle: 5 g aktivierte und neutralisierte Aktivkohle (Norit A) und 0,5 g Dextran T 70 auf 100 ml Assay-Puffer für LTB_4 bzw. LTC_4.
6) Testdurchführung: Alle Reagenzien mit Ausnahme des Standards und des Tracers (-20 °C) wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die Tests wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen ausgeführt, die in vorgekühlte Metallblöcke eingesetzt waren. Alle Testansätze erfolgten als Doppelbestimmungen. Das Testvolumen betrug stets 150 µl (Tab. 2), das Endvolumen nach Zugabe der Aktivkohle war 1150 µl.

Alle Testansätze wurden unter Argon 4,8 abgefüllt, gevortext und 16 Stunden lang bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zur weiteren Bearbeitung standen die Proben auf Eis.

Zum Blank, zum Nullwert und zu allen Standards der Eichkurve sowie zu den eigentlichen Proben wurde je 1 ml Aktivkohle-Lösung, die ständig bei 4 °C auf einem Magnetrührer gerührt wurde, hinzugegeben. Anschließend wurde erneut gevortext und 15 Minuten inkubiert.

Tab. 2: Pipettierschema für Radioimmunoassays (LTB_4 und LTC_4).

Reagenz \ Probe	Total	NSB (Blank)	B_o (Null-bindung)	Standard	Probe
Puffer	1100 µl	100 µl	50 µl	-	-
Standard	-	-	-	50 µl	-
Probe	-	-	-	-	50 µl
Tracer	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Antikörper	-	-	50 µl	50 µl	50 µl
Aktivkohle	-	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Die Trennung von gebundener und ungebundener Aktivität erfolgte bei 4 °C durch 15-minütige Zentrifugation mit einer Eppendorfzentrifuge bei 12 000 g. Exakt 1 ml des Überstandes wurde in Zählgefäße abpipettiert, mit 15 ml Toluolszintillator versetzt, geschüttelt, und im Flüssig-Szintillations-Zähler 4 Minuten lang mit Quench-Korrektur gezählt.

Die Auswertung und Darstellung der Zählergebnisse erfolgte mit einem Tischcomputer und einem RIA-Programm. Für das Eichdiagramm wurde der Logarithmus der Standardkonzentration im Test (Abszisse: 100 pg/Test) gegen den Quotienten aus Nettobindung der Standards und der Nullbindung in Prozent (Ordinate: net $\frac{Bi}{B_o}$ in %) aufgetragen. Eine Linearisierung der Ordinate gelang durch Logit-Transformation (Abb. 7):

$$\text{logit}\left(\frac{B_i - NSB}{B_o - NSB}\right) = \text{logit net}\,\frac{B_i}{B_o} = \ln\left(\frac{B_i - NSB}{B_o - B_i}\right)$$

Für die Logit-Darstellung des Eichdiagrammes wurde die Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient berechnet. Anschließend folgte die Eingabe der Counts der unbekannten Proben.

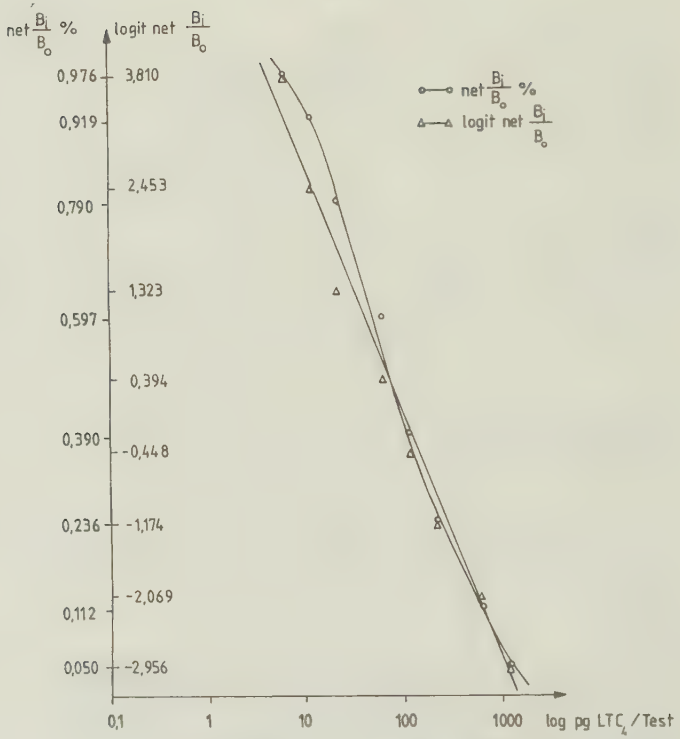


Abb. 7: Beispiel eines Eichdiagramms für LTC_4 im Linear-Log-Plot (o——o) bzw. nach Logit-Log-Transformation (Δ——Δ).

2.10. Dünnschicht-Chromatographie für Lipoxygenase-produkte

Zur Reinheitsprüfung von Standardsubstanzen und als einfache und schnelle Screeningmethode für Lipoxygenaseprodukte (außer Sulfidopeptid-Leukotriene) aus der Inkubation von Biopsieproben dienten die beiden Laufmittelsysteme in Tab. 3, die mit gleichem Trennergebnis angewandt wurden:

Tab. 3: Laufmittelsysteme zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Arachidonsäure sowie Mono- und Dihydroxy-Eicosatetraensäuren auf Silicagelplatten.

System	Benzol (vol)	Toluol (vol)	Äther (vol)	Äthanol (vol)	96% Essigs. (vol)
1	50	-	40	2	0,2
2	-	51	40	1	0,2

Die zu analysierenden Substanzen wurden auf Platten mit 5 µg Silicagel aufgetragen, die vor der Startlinie eine Konzentrierungszone besaßen. Damit war gesichert, daß größere Probenvolumina als 20 µl das Trennergebnis nicht verschlechterten. Ein an das Silicagel gebundener Fluoreszensindikator erlaubte bei ausreichenden Materialmengen die Detektion der Substanzflecken unter der UV-Lampe. Als Alternative kam das Besprühen mit äthanolischem Phosphomolybdatreagenz in Frage. Bei kleinen Substanzmengen mit radioaktivem Material wurde ein Dünnschichtscanner eingesetzt.

Vor der Verwendung mußte das Silicagel zunächst 2 h bei 140 ^{o}C im Trockenschrank hitzeaktiviert werden. Danach wurden Standards bzw. Proben in einem Volumen zwischen 20 µl und 50 µl in Äthanol in der Konzentrierungszone mit Kapillaren oder Hamiltonspritzen aufgetüpfelt und kurze

Zeit an der Luft getrocknet. Der Abstand zwischen benachbarten Bahnen sollte 3 cm nicht unterschreiten.

Die Laufkammer war mit Aluminiumfolie umgeben, um die Lipoxygenaseprodukte während der etwa 2-stündigen Entwicklung des Chromatogramms vor Licht zu schützen. Ein Blatt Filterpapier sorgte für eine Anreicherung der Atmosphäre im Chromatographietank mit Laufmitteldampf, der zusätzlich mit Argongas aufgefüllt wurde.

Der Lauf des Chromatogramms wurde beendet, wenn die Laufmittelfront noch etwa 2 cm vom oberen Ende der Platte entfernt war. Mit der hier vorgestellten Methode konnten die wichtigsten Standardsubstanzen zufriedenstellend getrennt werden (Abb. 8).

Die Auswertung des Chromatogramms mit radioaktiv markierten Proben geschah mit Hilfe eines Dünnschicht-Scanners plus Verstärker. Als Trägergas wurde Methan verwendet. Die Tab. 4 zeigt die R_f-Werte des Benzol-haltigen Laufmittelsystems.

Tab. 4: R_f-Werte von Arachidonsäure, 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE und LTB_4 (Bedingungen siehe Abb. 8).

Substanz	R_f-Wert
LTB_4	0,14
5-HETE	0,40
12-HETE	0,49
15-HETE	0,49
AA	0,68
unbekannter Peak	0,43

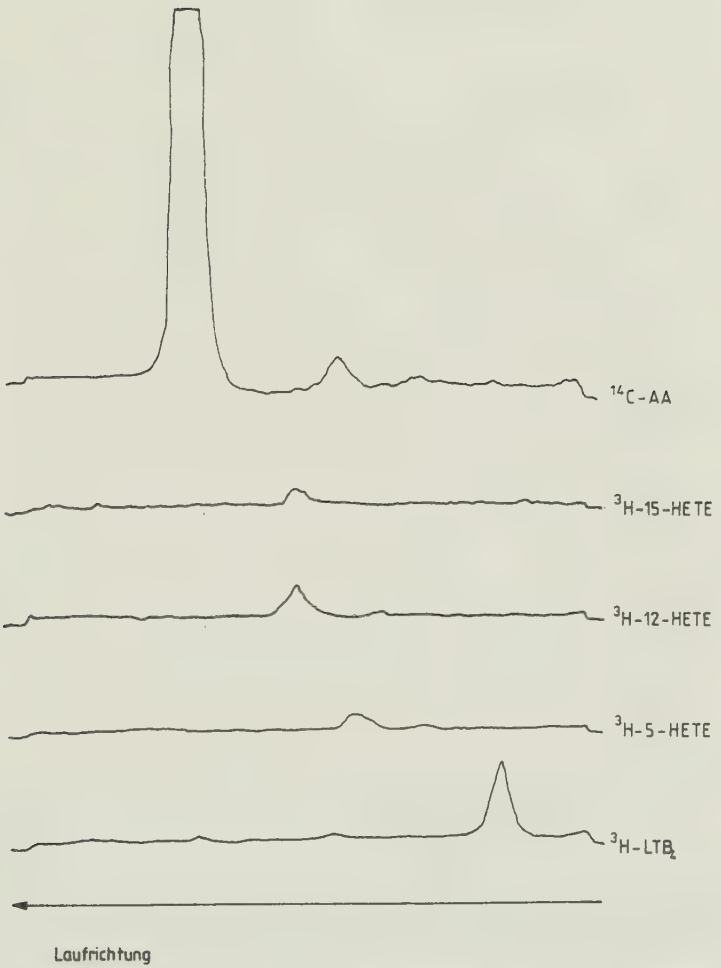


Abb. 8: Dünnschicht-Chromatogramm von Standards aus ^{14}C-Arachidonsäure, ^{3}H-15-HETE, ^{3}H-12-HETE, ^{3}H-5-HETE und ^{3}H-LTB$_4$ (jeweils ca. 20 000 cpm/20 µl).
Laufmittel: Benzol/Äther/Äthanol/96% Essigsäure 50/40/2/0,2 v/v/v/v.
Platte: Whatman LK 5 F.
Registriergeschwindigkeit des Dünnschichtscanners: 60 mm/h.

2.11. UV-Spektroskopie

Leukotriene, Hydroxy-Eicosatetraensäuren und zahlreiche Prostaglandine wie z.B. Prostaglandin B_2 (PBG_2) besitzen UV-Spektren mit charakteristischen Absorptionsmaxima und typischem Verlauf entprechend der chemischen Struktur der Moleküle. Neben der Bestimmung der Konzentration von Standards mittels des molaren Extinktionskoeffizienten (Lambert-Beer´sches Gesetz) war es möglich, noch zusätzliche Informationen über die Eigenschaften der untersuchten Substanzen zu erhalten. Durch Vergleich mit Daten aus der Literatur und Ergebnissen anderer Methoden konnten unbekannte Materialien identifiziert werden. Allerdings ist darauf hinzuweisen, daß bereits geringfügige Unterschiede im experimentellen Ansatz wie z.B. die Auswahl des Lösungsmittels oder die Herkunft der Substanzen (chemisch/biochemisch) die Resultate eines Meßverfahrens erheblich beeinflussen konnten (132, 133) und eine korrekte Interpretation erschwerten. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über wichtige Daten der Leukotriene, Hydroxy-Eicosatetraensäuren und des Prostaglandins B_2 (Literaturangaben in Klammern).

Die Erstellung der Spektren erfolgte mit einem kontinuierlich registrierenden Spektralphotometer. Nach Nullabgleich mit der Referenzküvette wurde das UV-Spektrum von 300 nm an bis 220 nm abgefahren. Beispiele für Form und Charakteristika der Spektren sind in den Abb. 9 bis 12 zu finden.

Aus den Abbildungen wird ersichtlich, daß sich die 3 chemisch unterschiedlichen Hauptgruppen in ihren Spektren eindeutig voneinander unterscheiden. Auffallend war die dreigipflige Form des UV-Scans bei den konjugierten Trienen (LTA_4-ME bis LTE_4). Hier wurde die maximale Absorptionsdifferenz bei λ = 280 nm zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Leukotrien A_4 war nur in Form seines Methyl-

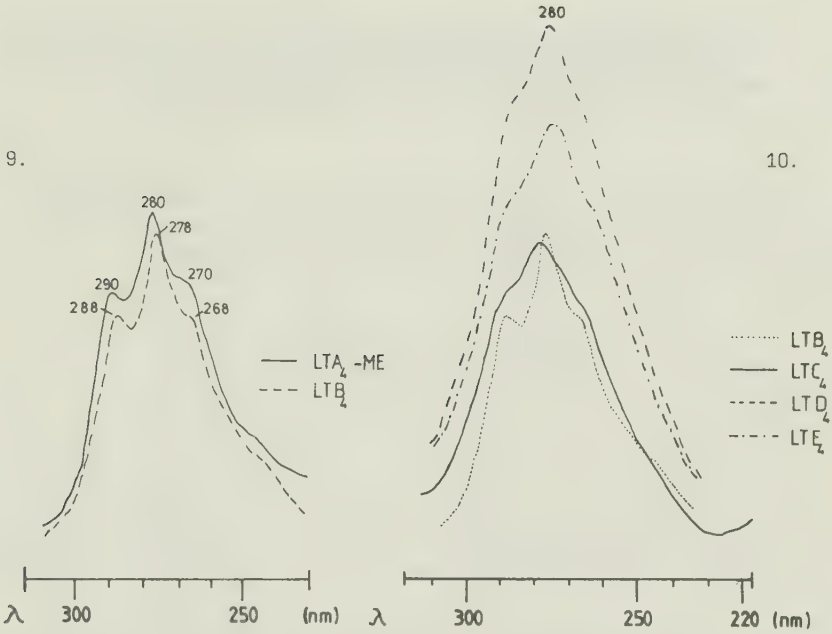


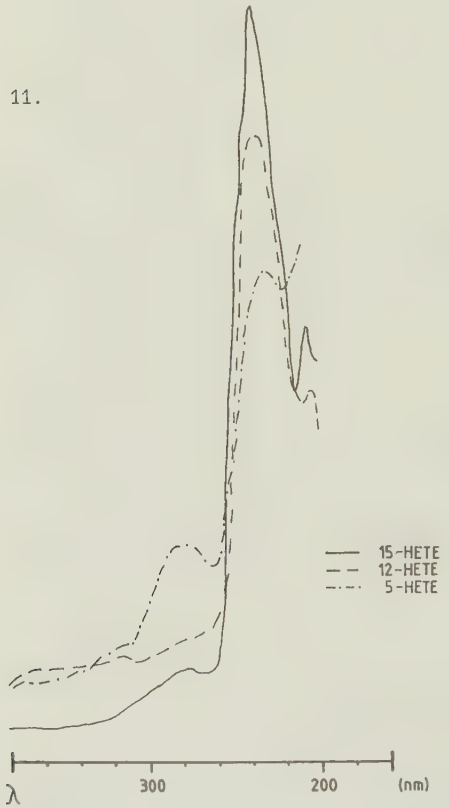
Abb. 9 und 10: UV-Spektren von Leukotrien A_4-Methylester (an C_1) in Hexan/1% Triäthylamin, Leukotrien B_4 in Methanol, Leukotrien C_4, D_4 und E_4 in Methanol/Wasser 1 : 1.

esters bedingt stabil. Darüber hinaus war es auch mit Einschränkungen möglich, zwischen LTB_4 und den peptidhaltigen Leukotrienen zu differenzieren.

Mit Hilfe der UV-Spektroskopie konnte also relativ leicht die Konzentration von Standards, die mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgereinigt wurden, bestimmt werden. Andererseits gaben die UV-Spektren von neu im HPLC-Chromatogramm auftretenden Peaks Hinweise auf die Struktur der fraglichen Substanzen. Allerdings waren dieser Methode insofern Grenzen gesetzt, als zur sicheren Registrierung eines UV-Spektrums je nach Substanz ca. 0,5 bis 1 µg an Material notwendig waren (129). Auf diese Weise konnten

auch Spektren von Substanzen aufgezeichnet werden, die aus biologischem Material isoliert wurden (108).

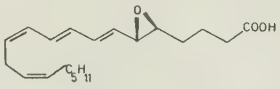
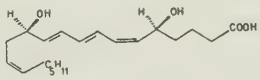
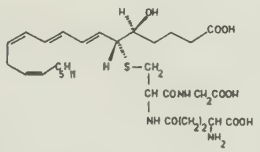
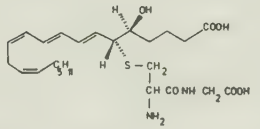
11.

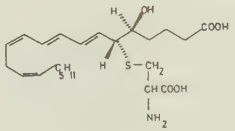
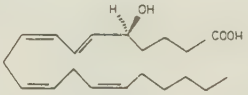
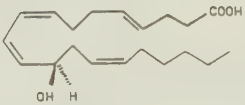
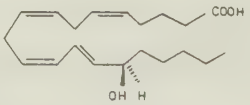
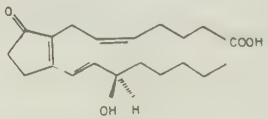


12.

Abb. 11 und 12: UV-Spektren der Monohydroxy-Eicosatetraensäuren 5-HETE, 12-HETE und 15-HETE in Methanol/Wasser 75/25 sowie von Prostaglandin B_2 (PGB_2) in Acetonitril.

Tab. 5: Strukturformeln, Molekulargewichte, Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten der Leukotriene, Hydroxy-Eicosatetraensäuren und von Prostaglandin B_2.

Substanz	Strukturformel und Molekulargewicht	Absorptions-maxima λ_{max} (nm)	Molarer Extinkt.-koeffiz. ε
LTA_4	 MG = 332 (88, 134)	270/280/290	40 000
LTB_4	 MG = 336 (88, 112, 128, 133, 135 - 137)	260/270/281 268/278/288	50 000
LTC_4	 MG = 625 (128, 140, 141)	270/280/290	ca. 40 000
LTD_4	 MG = 496 (128,140)	270/280/290	ca. 40 000

Substanz	Strukturformel und Molekulargewicht	Absorptions-maxima λ_{max} (nm)	Molarer Extinkt.-koeffiz. ε
LTE_4	 MG = 439 (140)	270/280/290	ca. 40 000
5-HETE	 MG = 320 (129, 143)	235	27 600 30 500 (Grünen-thal)
12-HETE	 MG = 320 (129, 143)	235	27 600 30 500 (Grünen-thal)
15-HETE	 MG = 320 (129, 143)	235	27 600 30 500 (Grünen-thal)
PGB_2 = int. Stand.	 MG = 336 (128, 129, 144)	278	28 650

LTA_4: Aufbewahrung und Messung in Hexan und 1% Triäthylamin als Leukotrien A_4-Methylester. Hydrolyse zur freien Säure in EtOH/0,1 N NaOH 1:1 in 30 min. bei Raumtemperatur (88) oder durch Zugabe von 0,2 ml Methanol/0,3 M NaOH 1:1 in 30 min. bei Raumtemperatur zu 0,6 - 3 µg LTA_4-Methylester (134).

LTB_4: Aufbewahrung und Messung in 100% Methanol. Extinktionskoeffizienten des Absorptionsmaximums und der Co-Maxima λ = 270 nm: 51 000, λ = 260 nm: 38 000, λ = 281 nm: 39 000 (138). Extinktionsmaxima der anderen Dihydroxy-Eicosatetraensäuren sind um 2 nm ins kurzwellige oder langwellige UV verschoben.

Die Auftrennung von LTB_4, den Isomeren und weiteren Dihydroxy-Eicosatetraensäuren kann mit SP-HPLC: Nucleosil 50, 5 µm; Laufmittel Hexan/Isopropanol/Essigsäure 95/5/0,2, 1 ml/min. (88) oder RP-HPLC: Nucleosil C_{18}, 5 µm; Methanol/Wasser/Essigsäure 75/25/0,1 pH 5,4 (139) erfolgen.

LTC_4: Extinktionsmaximum des 11-trans-LTC_4 bei λ = 278 nm, Schulter bei λ = 268 und bei λ = 290 nm (140, 141). 15-OH-LTC_4 (konjugiertes Trien) mit Extinktionsmaximum bei λ = 307 nm (142). Extinktionsmaximum von LTC_4-Sulfoxid bei λ = 284 nm. Weitere Referenzen über Sulfidopeptid-Leukotriene und Dihydroxy-Eicosatetraensäuren bei (133), insbesondere Multiplikationsfaktoren zur Umrechnung von Extinktion in Konzentration bei λ = 280 nm. Hinweise auf Veränderung der Absorption durch Lösungsmittel.

LTD_4: 11-trans-LTD_4 mit Extinktionsmaximum bei λ = 278 nm, Schultern bei 268 und 290 nm (140, 141).

2.12. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) von Leukotrien B_4

Für nahezu alle stabilen Metabolite der Cyclooxygenase- bzw. der Lipoxygenase-Reaktionen aus Arachidonsäure liegen Verfahren vor, durch welche die genannten Produkte im Nanogramm- oder sogar im Picogramm-Bereich anhand ihrer Massenfragmente eindeutig identifiziert werden können (115, 145 - 150). In neuerer Zeit wurden auch Methoden beschrieben (Fast Atom Bombardment, FAB (142, 148) und Desorption-Chemical Ionization, DCI, (145)), die die massenspektrometrische Bestimmung von Sulfidopeptid-Leukotrienen erlauben, wobei jedoch Mengen im unteren Mikrogrammbereich eingesetzt werden müssen. Bei der zuerst genannten Methode ist eine Derivatisierung nicht notwendig, bei dem zweiten Verfahren ist eine Acetylierung erforderlich.

Bei dem hier vorgestellten Beispiel zur Analyse von LTB_4 arbeitete der Gaschromatograph-Massenspektrometer vorzugsweise mit dem Modus Negativ-Ionen-Chemische-Ionisation (NICI) und dem Modus Positiv-Ionen-Electron-Impact (PIEI). Die gaschromatographische Trennung erfolgte an einer 50 m langen Silica-Kapillarsäule mit chemisch gebundener Phase und einem Temperaturprogramm zwischen 190 ^{o}C und 300 ^{o}C. Interface und Ionenquelle des Massenspektrometers arbeiteten bei 305 ^{o}C bzw. 200 ^{o}C. Als Trägergas wurde Helium benutzt, als Reaktandgas Methan. Die Registrierung der Chromatogramme erfolgte im Selected Ion Monitoring-Modus (SIM).

Um die Mono- und Dihydroxy-Eicosatetraensäuren für die GC-MS-Auftrennung in eine flüchtige Form zu überführen, mußten die Substanzen derivatisiert werden, d.h. funktionelle Gruppen (z.B. Hydroxy-, Keto-, Carboxy-Funktionen) wurden durch Derivatisierung mit geeigneten Reagenzien umgesetzt, ohne daß das chemische Grundgerüst des gesuch-

ten Stoffes verändert wurde. Nach Ionisierung im Massenspektrometer bildeten sich charakteristische Fragmente, die entsprechend ihrer Masse detektiert werden konnten.

Zur Messung im NICI-Modus wurde Reinsubstanz von Leukotrien B_4 zum Pentafluorobenzylester-bis(trimethylsilyl)-äther ($PFB\text{-}TMS_2$, Masse 660) derivatisiert (Abb. 13) und zu den Massen m/z = 479 (Masse - 181)$^-$ und m/z = 389 (181 - 90)$^-$ fragmentiert, wie in Abb. 14 zu sehen (146).

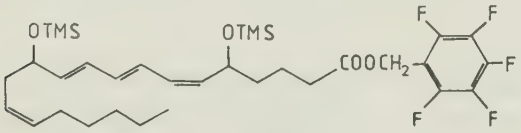


Abb. 13: Derivatisierung von Leukotrien B_4 zum Pentafluorobenzylester-bis(trimethylsilyläther) $LTB_4\text{-}PFB\text{-}TMS_2$.

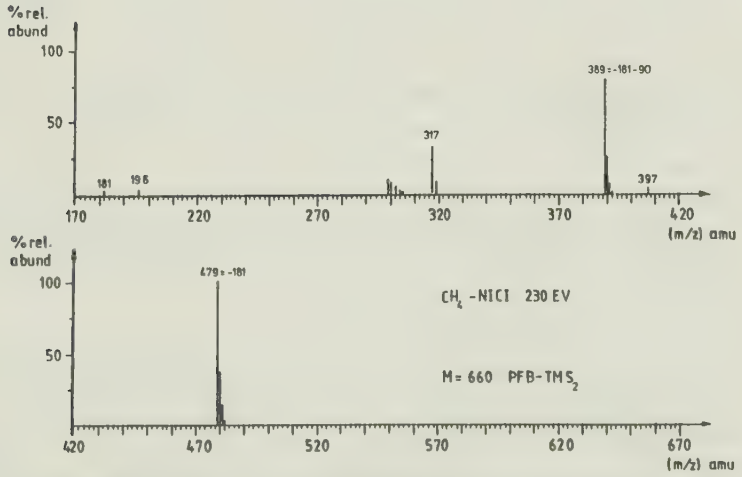


Abb. 14: Massenspektrum von $LTB_4\text{-}PFB\text{-}TMS_2$ mit NICI (Negativ-Ionen-Chemische-Ionisation).

In analoger Weise entstanden im Positiv-Ionen-Electron-Impact-Modus aus dem LTB_4-Äthylester-bis(trimethylsilyl)-äther-Derivat (LTB_4-Et-TMS_2. Masse = 508) die Fragmente m/z = 397 (Masse - 111)$^+$ und m/z = 307 (Masse - 111 - 90)$^+$.

Messungen von Standards und von Materialien, die aus biologischen Proben stammten, erfolgten hauptsächtlich im NICI mit dem PFB-TMS_2-Derivat von LTB_4 bzw. ^{3}H-LTB_4.

2.13. Stabilität und Metabolismus von LTB_4 und LTC_4 im Urin

Im Hinblick auf die Art der Probengewinnung und Lagerung sowie der vorgeschlagenen Extraktionsverfahren kommt der Frage nach der Stabilität und nach der Degradation von Leukotrienen in biologischen Medien große Bedeutung zu. Unter diesem Aspekt wurde das Verhalten von LTB_4 als Vertreter der Dihydroxy-Eicosatetraensäuren und von LTC_4 als Vertreter der Sulfidopeptid-Reihe in Urin bei 37 °C, in Dunkelheit und unter Luftausschluß überprüft.

Beide Leukotriene wurden getrennt oder zusammen unter ständigem Rühren in Mengen, die mit UV-Detektion zu erfassen waren, in Verbindung mit radioaktiv markiertem Material inkubiert. Die Urine stammten von nierengesunden Probanden. Die Versuchsanordnung, mit der die physiologischen Bedingungen in der Harnblase imitiert wurden, ist in Abb. 15 dargestellt.

Vor Zugabe der Leukotriene wurde ein Leerwert entnommen (Blank). Unmittelbar danach (Zeit: t = 0) und zu festgelegten Zeitpunkten der Inkubation (5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150 und 180 Minuten; 4, 12 und 22 Stunden) erfolgten weitere Entnahmen. Es wurden jeweils 2 x 10 ml Urin entnommen und entsprechend den oben

vorgestellten Methoden für die Auswertung mit Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Radioimminoassay und Gas-chromatographie-Massenspektrometrie vorbereitet.

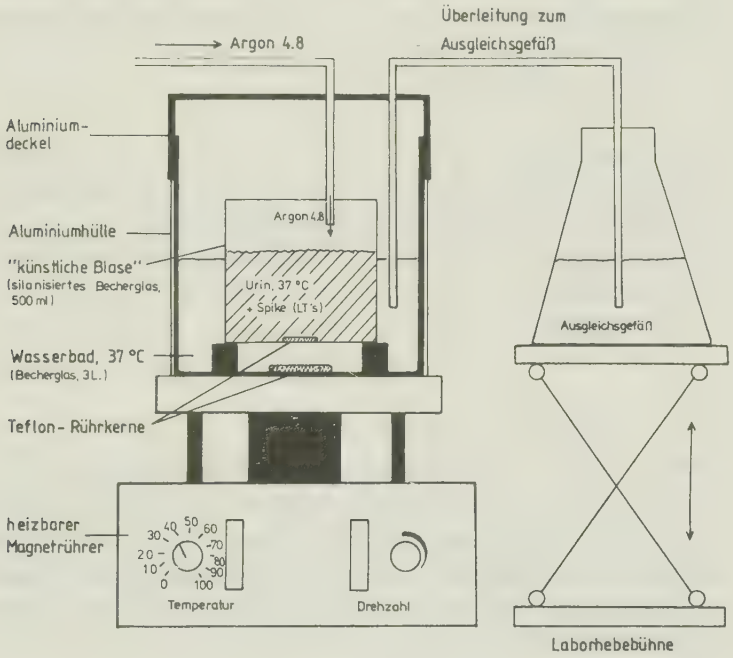


Abb. 15: Modell der "künstlichen Blase". Inkubation von LTB_4 und LTC_4.

3. Ergebnisse

3.1. Analytik von Urinproben

Bei Urin lag eine komplexe Matrix ständig variierender Zusammensetzung vor, wobei mit drei wesentlichen Gruppen von Störfaktoren zu rechnen war:
1) lösliche Eiweiße und Zellen,
2) Salze und pH Wert und
3) Urinfarbstoffe.
Zu ihrer Beseitigung diente eine Kette von Aufreinigungsschritten, die sorgfältig aufeinander abgestimmt sein mußten und welche die gewünschten Substanzen möglichst in unveränderter Form und in ausreichender Konzentration verfügbar machten.

3.1.1. Probenvorbereitung

Erster Schritt in der Aufarbeitungsprozedur war die Fällung des im Urin vorhandenen Eiweißes und der zellulären Bestandteile. In einem Verhältnis von drei Teilen Alkohol zu einem Teil wäßriger Probe war eine zufriedenstellende Präzipitation möglich. Wurden die mit Äthanol gefüllten Probenbehälter auf Trockeneis vorgekühlt, war die Eiweißfällung nahezu vollständig.

Der Vorteil der Vorbehandlung biologisch aktiver Proben mit dieser Methode bestand darin, enzymatische und nichtenzymatische Reaktionen und Umwandlungen von Leukotrienen und anderen Prostanoiden wirkungsvoll zu unterbinden. Stoffwechselvorgänge in Zellkulturmedien und in Inkubationsansätzen mit biologischen Proben konnten zu definierten Zeitpunkten gewissermaßen fixiert werden.

Für die weitere Handhabung der Proben war von Vorteil,

daß sie in dieser Form der Konservierung (Äthanol.Wasser-Gemisch, neutraler pH-Wert, Argon-Atmosphäre, Lichtschutz) selbst bei langfristiger Lagerung bei - 80 °C flüssig blieben, so daß die Proben nach Portionierung direkt aufgearbeitet werden konnten (keine chemische Degradation bzw. kein biochemischer Abbau während des Auftauens).

Zusätzlich war noch von Bedeutung, daß Äthanol von allen organischen Lösungsmitteln mit entsprechender Polarität am leichtesten flüchtig ist. Dadurch war die Zeit, die zum Abziehen des Fällungsmittels am Rotationsverdampfer benötigt wurde, entsprechend kurz. Die Verluste bei diesem ersten Schritt der Probenaufarbeitung betrugen für LTB_4 5±3% und für LTC_4 9±5% ($\bar{x}$±SD, n=24).

3.1.2. Extraktion mit ODS-Silica

Einen großen Fortschritt in der Analyse biologischen Materials auf Produkte der Lipoxygenase und der Cyclooxygenase aus Arachidonsäure brachte die Einführung von Einmal-Kartuschen oder -Trennsäulen, die mit Silica-Material gefüllt sind.

Umfangreiche eigene Untersuchungen führten zu einer Methode, die Einmal-Trennsäulen in Verbindung mit einem Vakuumsystem zur Aufreinigung von Leukotrienen aus Urin benutzte. Als optimal erwies sich ein stufenweises Vorgehen sowohl beim Auftragen als auch bei der Extraktion der Proben. Die Optimierung der vorgestellten Trennsysteme wird im Folgenden besprochen.

3.1.3. Einfluß der stationären Phase

Die Qualität der Oberflächenbeschichtung des Silica-Trägers mit ODS-Silica-Gruppen und der Grad der Nachsila-

nisierung polarer Restfunktionen bestimmen zusammen mit Partikelgröße und -form sowie dem Füllgewicht die Trennleistung von C_{18}-Einmal-Trennsäulen bzw. -Kartuschen (Abb. 16).

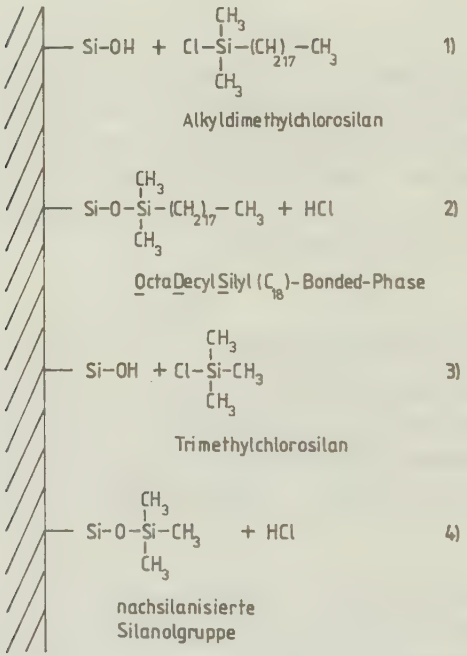


Abb. 16: Aufbau einer ODS(C_{18})-Bonded-Phase.
1 + 2 Kopplung von Alkyldimethylchlorosilan.
3 + 4 Nachsilanisieren (End Capping) noch freier Silanol-Gruppen mit TMCS.

Um eine optimale Festphase zu finden, wurden C_{18}-Material in Kartuschenform mit C_8- sowie C_{18}-Materialien in Säulenform bezüglich der Extraktionseigenschaften von markier-

ten und unmarkierten Reinsubstanzen an LTB_4 und LTC_4 aus Urinproben miteinander verglichen. Als Ausgangsaktivität galt jeweils die Menge an Substanz, die nach der Proteinfällung noch zur Verfügung stand. Zur Versuchsdurchführung im Einzelnen siehe Legende der Abb. 17.

Die Ausbeute für LTB_4 war bei beiden ODS-Silica-Materialien annähernd gleich (89±7% bzw. 78±13% für Trennsäulen bzw. für Kartuschen, $\bar{x}\pm SD$, n = 10). Die größere Streuung bei den Kartuschen ist auf die Verwendung von nicht sphärischen Silica-Partikeln zurückzuführen. Als ungeeignet zur Extraktion von LTB_4 mit der bezeichnenten Methode erwiesen sich C_8-Festphasen. Die Adsorption war schlechter als bei beiden ODS-Silica-Materialien, so daß die Recovery nur bei 42±12% lag.

Erwartungsgemäß unergiebiger fiel die entsprechende Extraktion von LTC_4 aus. Aufgrund seiner Polarität wurde es beim Auftragen und Waschen der Proben weniger gut auf der Säule zurückgehalten. Die gegenüber LTB_4 verminderte Bindungsfähigkeit an ODS-Silica-Phasen betrug ca. 10%. Weiter fiel auf, daß die Menge an LTC_4, die nach der Elution der gereinigten Probe noch auf der Trennsäule bzw. Kartusche haften blieb, größer war als der entsprechende Rest an LTB_4. Dieses paradoxe Verhalten war möglicherweise mit dem ampholytischen Charakter von LTC_4 zu erklären. Die mittlere Recovery betrug 79%±6% bzw. 64%±15% für Trennsäulen bzw. für Kartuschen. Bei der C_8-Phase war der Verlust beim Auftragen und Waschen fast so hoch wie der extrahierbare Anteil der Proben (48%±10%).

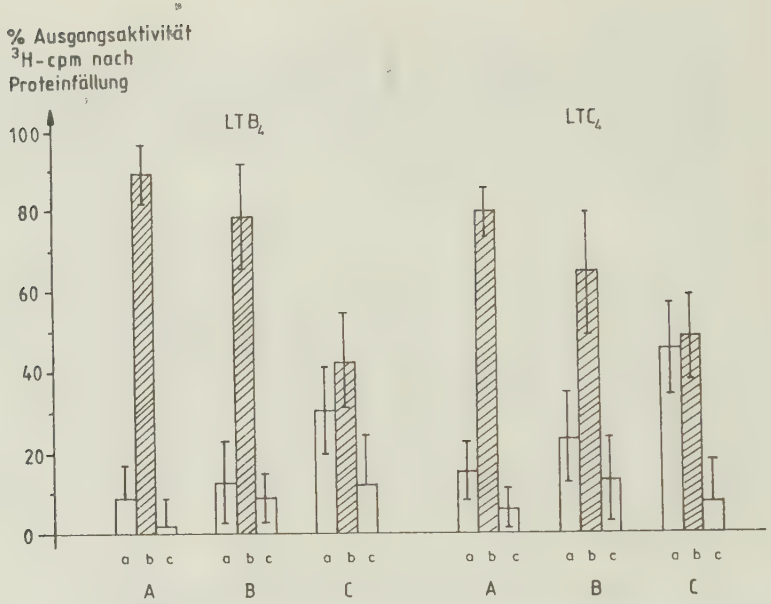


Abb. 17: Einfluß des Säulenmaterials auf die Recovery der Extraktion von LTB_4 und LTC_4 aus Urin mit
A: C_{18}-Einmal-Trennsäulen (Baker^R),
B: C_{18}-Einmal-Kartuschen (Waters^R) und
C: C_8-Einmal-Trennsäulen (Baker^R),
jeweils n=10, $\bar{x}\pm SD$).
a) Verlust durch Auftragen und Waschen (Messung im Eluat),
b) von der Säule bzw. Kartusche mit Elutionsmittel extrahierbare Probensubstanzen,
c) nicht extrahierbarer Probenanteil.

A: Optimiertes Extraktionsverfahren für Baker-C_{18}-Einmal-Trennsäulen (6ml Volumen; 500 mg ODS).
1) Auftragen der Probe in 2 x 5 ml 10 mM Phosphatpuffer + 0,9% NaCl, pH 5,0.
2) Entfernen der Salze mit 2 x 10 ml dest. Wasser.
3) Vorreinigung mit 5 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 pH 5,0 + 1mM Butylamin.

3.1.4. Einfluß der mobilen Phase

Kritische Störfaktoren bei dem vorliegenden Trennproblem waren Urinfarbstoffe, die sich trotz ihrer chemisch völlig andersartigen Natur in ihrem Löslichkeits- und Adsorptionsverhalten nur unwesentlich von LTB_4 und LTC_4 unterschieden. Die Problematik wurde in Vorversuchen deutlich, wobei Urinproben, die markiertes und unmarkiertes LTB_4 und LTC_4 enthielten, nach der üblicherweise vorausgehenden Proteinfällung auf Einmal-Trennsäulen aufgetragen und stufenweise mit einem ungepufferten Methanol-Wasser-Gemisch bei steigendem Gehalt an organischer Phase extrahiert wurden (Abb. 18).

Fortsetzung Legende Abb. 17

4) Trocknen mit Argongas.
5) Elution der Probe mit 4 x 0,5 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 pH 8,0.

B: Optimiertes Extraktionsverfahren für Waters-C_{18}-Einmal-Kartuschen (2 ml Volumen, 500 mg ODS).
Schritte 1) und 2) wie vorstehend.
3) Vorreinigung mit 5 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 pH 5,0 + 5 mM Butylamin.
4) Trocknen mit Argongas.
5) Elution wie vorstehend.

C: Versuchsweises Extraktionsverfahren für Baker-C_8-Einmal-Trennsäulen (6 ml Volumen, 500 mg Octylsilylsilica).
Schritte 1) und 2) wie vorstehend.
3) Vorreinigung mit 5 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 10/90/0,1 pH 5,0 + 1 mM Butylamin.
4) Trocknen mit Argongas.
5) Elution mit 4 x 0,5 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 pH 8,0.

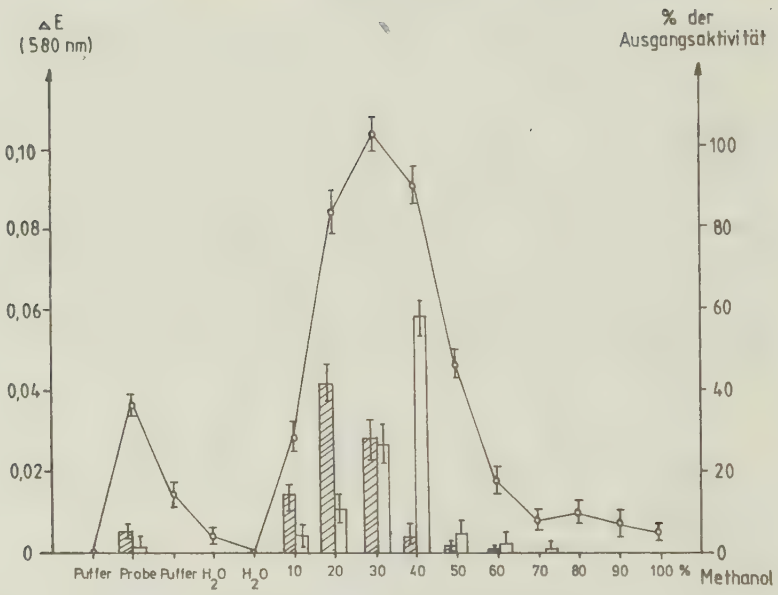


Abb. 18: Elution der Urinpigmente und der Leukotriene von ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen.

1) Auftragen der Proben in 2 x 5 ml Puffer.
2) Waschen mit 2 x 10 ml destilliertem Wasser.
3) Elution mit 10 x 5 ml ungepuffertem Methanol-Wasser-Gemisch mit steigendem Methanolgehalt.

Durchgezogene Linie: Färbung der Fraktionen durch Urinpigmente (λ = 580 nm);

offene Säulen: LTB_4;

schraffierte Säulen: LTC_4;

jeweils Prozent der Ausgangsaktivität im Eluat ($\bar{x}\pm SD$, n = 10).

Die polaren Urinfarbstoffe eluierten zunächst mit dem Phosphatpuffer, in dem die Proben nach dem Einengen im Vakuum aufgenommen wurden. Der Hauptanteil der unpolaren Urinfarbstoffe (Absorptionsmaximum bei λ = 580 nm) wurde bei einem Methanolgehalt zwischen 10 und 50% von der

Säule gewaschen (ausgezogene Linie). Bei diesem Anteil an organischer Phase am Laufmittel gingen LTB_4 und LTC_4 jedoch weitgehend verloren (Säulendarstellung).

Da offensichtlich mit unterschiedlichem Methanolgehalt im Laufmittel allein eine Abtrennung der Störfaktoren von den beiden Leukotrienen nicht möglich war, mußte die Polarität der einzelnen Komponenten durch den pH-Wert gesteuert und dadurch ihre Adsorption an die stationäre Phase beeinflußt werden. Dabei spielten sowohl der pH-Wert des Puffers, in dem die Proben aufgetragen wurden und der zugleich das Konditionierungsmedium für das Säulenmaterial darstellte, als auch der pH-Wert des Eluenten eine Rolle.

Wurde die Probe nämlich im alkalischen Milieu, z.B. bei pH 8, auf eine entsprechend vorbereitete Säule aufgetragen, dann wurden sowohl die Urinpigmente als auch LTB_4 und LTC_4 mit einem Laufmittel, das 65% Methanol bei einem pH-Wert von 8 enthielt, ähnlich schnell ausgewaschen wie mit reinem Methanol (Kurven 1 und 2 in Abb. 19). Dabei wurde im Gegensatz zum vorherigen Abschnitt jetzt die Zusammensetzung der mobilen Phase während der einzelnen Schritte der Elutionsphase konstant gehalten und die Menge an radioaktiver Substanz pro Milliliter Eluat bestimmt.

Wie der Abb. 19 zu entnehmen ist, konnte die Retention von LTC_4 auf der Trennsäule zu Beginn der Extraktion deutlich verbessert werden, wenn der Puffer, in dem die Proben aufgetragen wurden, einen sauren pH-Wert besaßen, während der pH-Wert des Eluenten zur Extraktion im Neutralen bis leicht Alkalischen lag (Kurven 3 bis 5). Wegen der Säureempfindlichkeit der Sulfidopeptid-Leukotriene (Hydrolyse) waren diesem Ansatz allerdings Grenzen gesetzt. Zudem war der Zugewinn an extrahierbarem

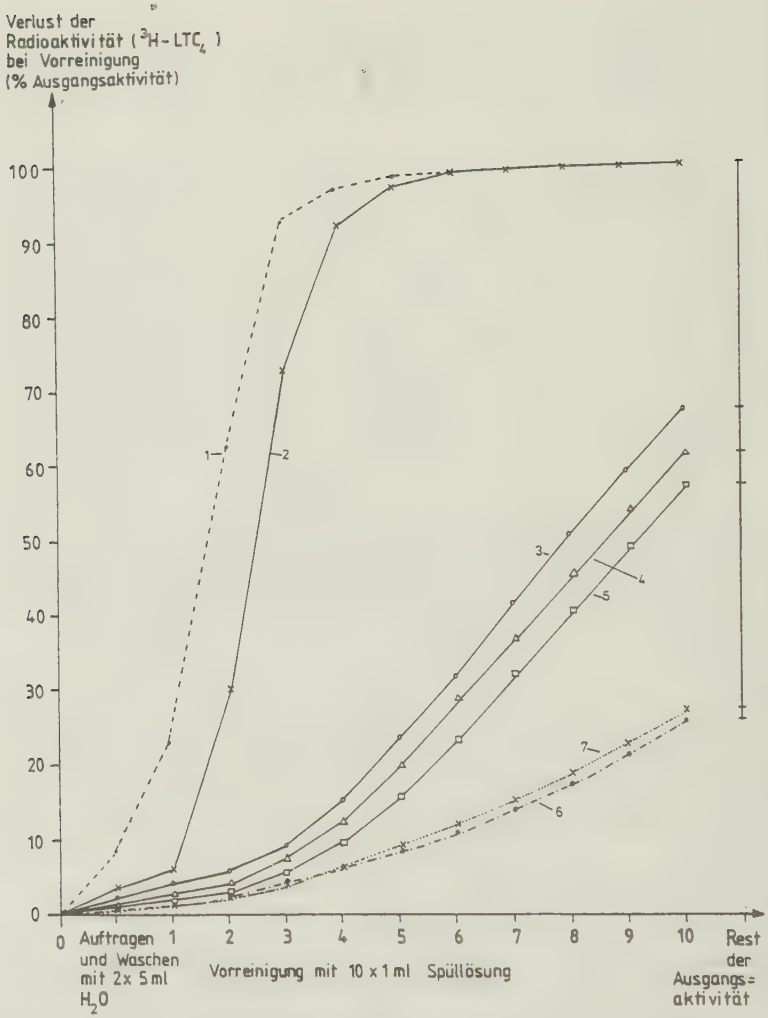


Abb. 19: Einfluß des pH-Wertes beim Konditionieren von ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen sowie beim Auftragen und Vorreinigen von Urinproben, die LTC_4 enthalten.

LTC_4 bei pH-Werten unter 5,0 in dem Maße nicht mehr von Bedeutung.

Ein weiterer Fortschritt konnte durch Verwendung einer methanolischen Waschlösung mit saurem pH-Wert zum Entfernen der Störfaktoren erzielt werden (Kurven 6 und 7 aus Abb. 19). Durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt mit 10 ml Waschlösung der Zusammensetzung Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 v/v/v pH 5,0 gingen einschließlich der bereits beschriebenen Maßnahmen weniger als 30% der Ausgangsaktivität an LTC_4 verloren.

Allerdings blieb das Retentionsverhalten der Urinfarbstoffe von diesen Manipulationen nicht unbeeinflußt. Ihre Elution verzögerte sich ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße als diejenige der Leukotriene. Deshalb

Fortsetzung Abb. 19

Konditionieren der Trennsäule mit:	Auftragen der Probe mit:	Eluieren der Probe mit:
1 Methanol und Wasser	Wasser	100% Methanol
2 Methanol und Wasser	Phosphatpuffer pH 8,0	Methanol/Wasser 65/35 pH 8,0

	Konditionieren der Trennsäule mit: (Methanol und Phosphatpuffer)	Auftragen der Probe mit: (Phosphatpuffer)	Eluieren (Kurve 3-5) bzw. Vorreinig.(Kurve 6+7) der Probe mit: (Methanol und Wasser 65/35)
3	pH 8,0	pH 8,0	pH 6,8
4	pH 5,5	pH 5,5	pH 6,8
5	pH 3,0	pH 3,0	pH 6,8
6	pH 5,0	pH 5,0	pH 5,0
7	pH 3,0	pH 3,0	pH 3,0

mußte als dritter Faktor die Ionenstärke kontrolliert verändert und ein Gegenion zur Bildung von Ionenpaaren eingeführt werden. Dies geschah unter dem Gesichtspunkt, daß die Oberfläche der stationären Phase offensichtlich nicht völlig mit ODS-Silica-Gruppen abgesättigt war und deswegen nicht in idealer Weise den Reverse Phase-Bedingungen mit ausschließlich lipophilen Oberflächenfunktionen entsprach.

Über den pH-Wert der Waschlösung und des Eluenten, der mit Essigsäure und/oder Ammoniak eingestellt wurde, konnte bereits eine deutliche Wirkung auf die Ionisierung der Moleküle der mobilen Phase und der Festphase ausgeübt werden. Beim Einengen der Eluate bildeten sich jedoch nichtflüchtige Salze, die im Verlauf der weiteren Probenbearbeitung störten. Deshalb konnten deren Mengen nicht beliebig erhöht werden. Stattdessen wurde als Ionenpaar-Reagenz Butylamin verwendet, das diesen Nachteil nicht aufwies. Bei einem pH-Wert von 5,0 überwogen vor allem am Molekül von LTC_4 negative Ladungen, die durch die Wirkung von Butylamin vermindert werden konnten (Abb. 20). Mit Hilfe von Butylamin als Gegenion ergab sich eine eindeutig verlängerte Retention von LTC_4 am Säulenmaterial. Auf LTB_4 hatte Butylamin hingegen keinen so gravierenden Einfluß, da weniger ionisierbare Gruppen in diesem Molekül vorliegen.

Aus Abb. 20 läßt sich weiter entnehmen, daß eine Menge an 5 ml Waschlösung der Zusammensetzung Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/o,1 v/v/v pH 5,0 mit Zusatz von 1 mM Butylamin ausreichte, um eine weitestgehende Abtrennung von Störfaktoren zu erzielen, die polarer als LTB_4 und LTC_4 waren. Größere Mengen an Waschlösung verschlechtern die Ausbeute. Weiter erwies sich eine Konzentration des Gegenions von 1 mM als optimal. Größere Mengen Butylamin verschlechtern die Ausbeute für LTB_4 und LTC_4. Interessanterweise traf dieses Phänomen allerdings nur auf das

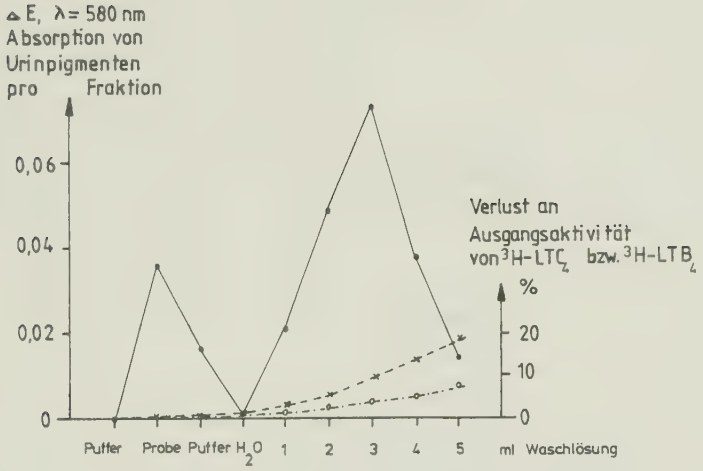


Abb. 20: Einfluß des Ionenpaar-Reagenz Butylamin auf das Retentionsverhalten von LTB_4 und LTC_4 sowie auf die Verbesserung der Abtrennung von Störfaktoren.

1) Konditionieren: Methanol und Phosphatpuffer pH 5,0,
2) Probe: Phosphatpuffer pH 5,0,
3) Auswaschen von Salzen: Wasser,
4) Vorreinigen: 5 x 1 ml Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 pH 5,0 und 1mM Butylamin.

•—• Färbung durch Urinpigmente.
o---o ^3H-LTB_4 im Eluat.
×---× ^3H-LTC_4 im Eluat.

ODS-Silica-Material von Baker in Form von Einmal-Trennsäulen zu, wohingegen eine Anhebung der Konzentration des Gegenions bis in den Bereich von 10 mM Butylamin in der Waschlösung auf die Vorreinigung von LTB_4 und LTC_4 mit Hilfe der ODS-Einmal-Kartuschen (Waters) keinen derartigen Effekt aufwies. Als Erklärung für dieses Phänomen kämen am ehesten bei sonst gleichen Bedingungen der geringere Silanisierungsgrad und die weniger homogene Par-

tikelstruktur des zuletzt genannten C_{18}-Materials in Betracht. Auf eine gleichlautende Problematik wird noch im Abschnitt 3.1.6.: Probenaufreinigung mit HPLC hingewiesen.

Mit Hilfe der genanntn Überlegungen und Maßnahmen war es möglich, die Bindung von LTB_4 und vor allem LTC_4 an ODS-Silica zu optimieren und zugleich eine zufriedenstellende Abtrennung von störenden Faktoren zu erreichen. Umgekehrt war im Anschluß daran die möglichst einfache und vollständige Elution der gesuchten Substanzen erforderlich. Dazu mußten alle vorher geschaffenen Bedingungen aufgehoben bzw. umgekehrt werden.

Aus dem vorstehend Gesagten erklärt sich, daß die Elution von Proben, die LTB_4 und LTC_4 enthalten, mit reinem Methanol weder zweckmäßig noch ausreichend selektiv war. Stattdessen erwies sich anhand von Recovery-Studien in Verbindung mit photometrischen Messungen des Farbstoffgehalts der Probeneluate analog dem Vorgehen zur Bestimmung der optimalen Zusammensetzung der Waschlösung ein Anteil von 85% an Methanol im Eluenten als ausreichend, um das lipophile LTB_4 von der Einmal-Trennsäule zurück zu gewinnen. Damit eine annähernd gleiche Effizienz auch für das mit mehr polaren Funktionen ausgestattete LTC_4 erzielt werden konnte, mußte der pH-Wert der Elutionslösung auf 8,0 angehoben werden. Ferner war der Einfluß des Gegenions zu eliminieren. Die Umstellung der Ionisierung in der Einmal-Trennsäule auf die neuen Bedingungen ließ sich durch Umkonditionieren mit einem 10 mM Phosphatpuffer pH 8,0 erreichen.

Einfacher und gleich wirkungsvoll war es stattdessen, die ODS-Silica-Trennsäulen am Vakuum einige Minuten im Strom von Argongas trocknen zu lassen. Maximal 3 ml Eluat der Zusammensetzung Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 v/v/v pH 8,0 waren erforderlich, um eine Ausbeute von

89%±7% für LTB_4 und 79%±6% für LTC_4, $\bar{x}$±SD, n = 24) zu erzielen. Zusammenfassend ergab sich ein Optimum an Bedingungen sowohl beim Auftragen und Waschen von Urinproben als auch bei der Extraktion von Leukotrienen und mittelpolarer Substanzen mittels ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen. Die unteren und oberen Begrenzungen, die das "Fenster" zur Elution dieser Substanzen umschließen, sind in Abb. 21 dargestellt.

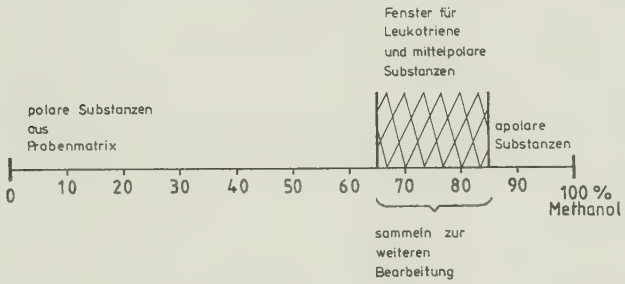


Abb. 21: "Fenstereinstellung" zur Extraktion von LTB_4 und LTC_4 aus Urin mit ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen.
Untere Grenze: Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1
pH 5,0 und 1mM Butylamin;
obere Grenze: Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1
pH 8,0, kein Gegenion.

3.1.5. Aufnahmekapazität von ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen

Bei großen Probenvolumina kann das Problem auftreten, daß das Trennmaterial in den Säulenkartuschen überladen wird. Dann wird zwar der erste Teil der Probe an die Festphase gebunden, ein unbestimmter Rest gelangt jedoch sofort ins Eluat.

In Vorversuchen wurde geprüft, ob sich mit Reinsubstanzen an tritium-markiertem und nicht markiertem LTB_4 und LTC_4 ein solcher Sättigungseffekt der Festphase nachweisen ließ. Dazu wurden von einer Probe, die bekannte Mengen an "heißer" und "kalter" Reinsubstanz in 10 mM Phosphatpuffer pH 5,0 enthielt, steigende Volumina auf die Säulen aufgetragen (Doppelansätze mit den Abstufungen 100 µl, 500 µl, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml; 100 µl Stammlösung enthielten 0,1 ng LTB_4 bzw. LTC_4 und 10^3 cpm ^{3}H-LTB_4 bzw. ^{3}H-LTC_4). Die Salze des Puffers wurden mit dest. Wasser entfernt. Die anschließende Elution erfolgte mit 100% Methanol, da eine Aufreinigung in diesem speziellen Fall nicht gewünscht war und nur dieser Eluent eine komplette Ablösung des gebundenen Materials ermöglichte.

Im Eluat wurden dann anhand der Zählausbeute mittels Flüssigszintillations-Messung die jeweils von der Säule zurückgewonnenen Counts bestimmt. Bei Proben mit ausreichend UV-detektierbarem Material wurde zusätzlich eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgeführt und die Fläche unter der Kurve mit einem Chromatogramm der entsprechenden Menge an Reinsubstanz verglichen.

Sowohl für markiertes als auch für unmarkiertes LTB_4 bzw. LTC_4 konnte bei Verwendung von Phosphatpuffer eine Überladung der hier verwendeten Einmal-Trennsäulen bis zu ei-

ner Größenordnung von 10^6 cpm und 100 ng pro Ansatz nicht nachgewiesen werden. Die Recovery für das Gesamtexperiment betrug 98%±6% für LTB_4 und 95%±8% für LTC_4.

Eine Anreicherung beider LT's aus großen Mengen an Puffer oder Inkubationsmedien war somit gegeben. Vergleichbare Volumina an biologischen Proben führten trotz Fällung und Zentrifugation zur Verstopfung der Einmal-Trennsäulen und zu einem drastischen Rückgang der Wiederauffindungsraten auf 20 bis 30%.

In einem umgekehrten Versuchsansatz zeigten sich keine unerwünschten Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und kleinsten Mengen an Reinsubstanz. Wurden gleichbleibende Probenvolumina, aber abnehmende Konzentrationen auf die Einmal-Trennsäulen aufgetragen, so erhielt man bis in den Bereich von 10 pg LTB_4 bzw. LTC_4 pro Ansatz (Recovery mit markierten Leukotrienen) noch über 90% des Ausgangsmaterials zurück. Damit war der Bereich, in dem die Daten für LTB_4 und LTC_4 in Urinproben erwartet und mit spezifischen Radioimmunoassays meßbar waren, hinreichend abgedeckt.

Um zu prüfen, ob diese Resultate auch auf biologische Proben zutrafen, wurden unterschiedliche Mengen an Urin mit einem entsprechenden Zusatz an markierter und unmarkierter Reinsubstanz (Ansätze zu 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml und 50 ml Urin; pro 1 ml Urin 500 pg LTB_4 bzw. LTC_4 sowie 1 000 cpm ^3H-LTB_4 bzw. ^3H-LTC_4) versetzt und anschließend mit 5 ml reinem Methanol eluiert. Die Radioaktivität im Eluat wurde im Flüssigszintillationszähler nach HPLC-Trennung von LTB_4 und LTC_4 gemessen. Zusätzlich wurde zur genauen Verfolgung der Adsorption der Leukotriene an das Säulenmaterial auch das Eluat beim Auftragen der Probe, beim zweimaligen Waschen mit Wasser und bei einer Kon-

troll-Elution der Säule mit weiteren 5 ml 100% Methanol untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 22 zu sehen. Auf

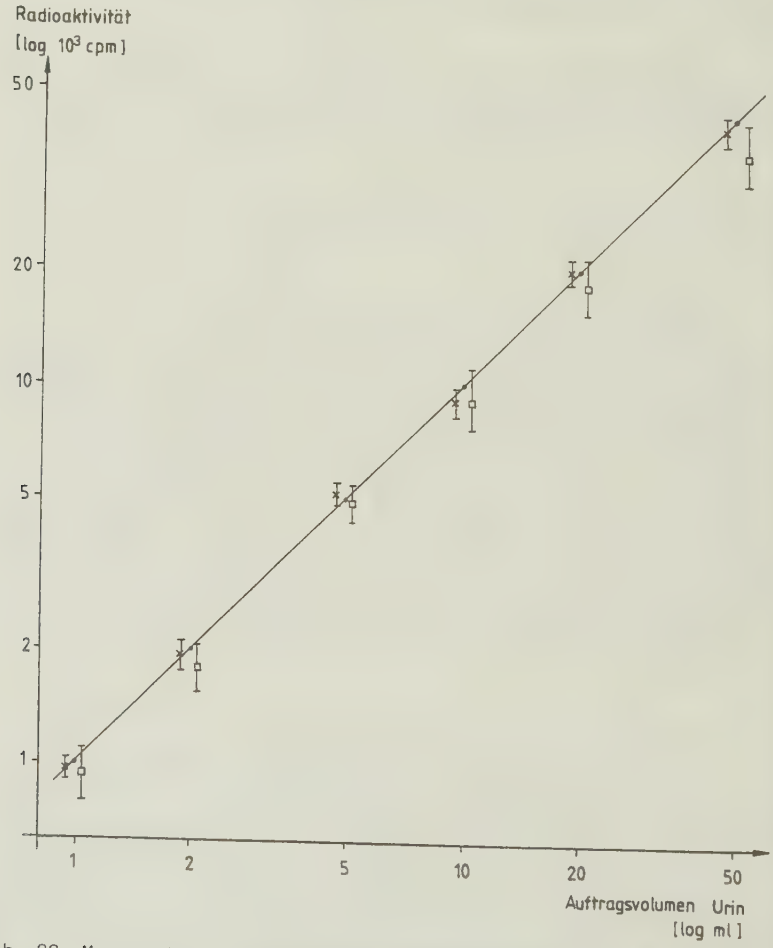


Abb. 22: Mengen der rückgewinnbaren Ausgangsaktivität (•) an tritiiertem Material als Ausdruck der Kapazität von ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen (6 ml, 500 mg Füllmaterial) für die Extraktion von LTB_4 (x) bzw. LTC_4 (□) aus menschlichem Urin ($\bar{x}\pm SD$, n = 4 pro Meßpunkt).

eine Vorreinigung der Proben mit Waschlösung, wie sie sonst für die weitere Aufarbeitung unumgänglich war, wurde bewußt verzichtet!

Weder während des Auftragens der Proben noch während des Auswaschens von Salzen, die im Urin oder im Puffer enthalten waren, ging Radioaktivität, die LTB_4 und LTC_4 zuzuordnen war und das übliche Maß an Hintergrundrauschen überstieg, verloren. Insofern wurde die kritische Kapazität von ODS-Silica-Einmal-Trennsäulen mit den beabsichtigten Probenvolumina nicht erreicht.

Beide Leukotriene ließen sich mit 100 % Methanol nahezu quantitativ von der Läule zurückgewinnen, allerdings mit dem bekannten Nachteil, daß bei diesem Vorgehen keine Abtrennung der störenden Urinpigmente möglich war (LTB_4 95%±7%, LTC_4 91%±9%; $\bar{x}$±SD für n = 24 des Gesamtexperiments). Dies kam vor allem darin zum Ausdruck, daß während der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Fraktionierung beider Metabolite zunehmend Überlagerungen mit im UV bei 280 nm detektierbaren Verunreinigungen auftraten. Wurden die Kartuschen ein zweites Mal mit reinem Methanol eluiert, dann ließ sich zunächst noch fehlendes LTB_4 bzw. LTC_4 vollständig extrahieren.

3.1.6. Probenaufarbeitung mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Entsprechend den Bedingungen der Reverse Phase-Chromatographie, wie sie anhand der ODS-Einmal-Trennsäulen zur Probenextraktion benutzt wurden, verteilen sich die im Laufmittel gelösten Substanzen zwischen einer hydrophoben stationären und einer polaren mobilen Phase. Je polarer die Zusammensetzung des Laufmittels ist, desto länger verweilen die Substanzen auf der Säule, wobei polare Stoffe (z.B. Prostaglandine, Thromboxan, Leukotriene) zuerst, apolare Stoffe (z.B. Mono- und Dihydroxy-Eicosatetraensäuren, Arachidonsäure) später eluieren (Abb. 23). Gänzlich polare und hydrophile Inhaltstoffe von Proben verlassen die Trennsäule mit der Laufmittelfront.

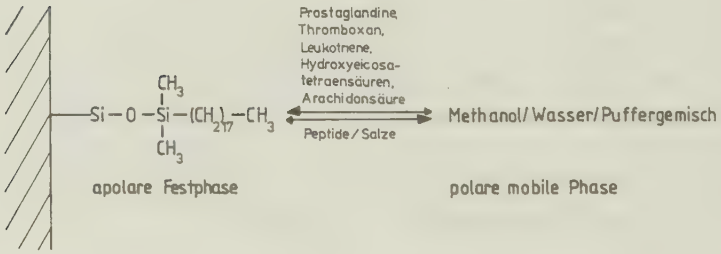


Abb. 23: Verteilung von Prostanoiden und Peptiden/Salzen zwischen stationärer und mobiler Phase bei der Reverse Phase-Chromatographie.

Nachfolgend soll die schrittweise Optimierung eines aus drei Komponenten bestehenden isokratischen Laufmittelsystems (Methanol, Wasser, Essigsäure) für die Reverse Phase-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) von Prostaglandin B_2 (PGB_2, interner Standard), LTB_4

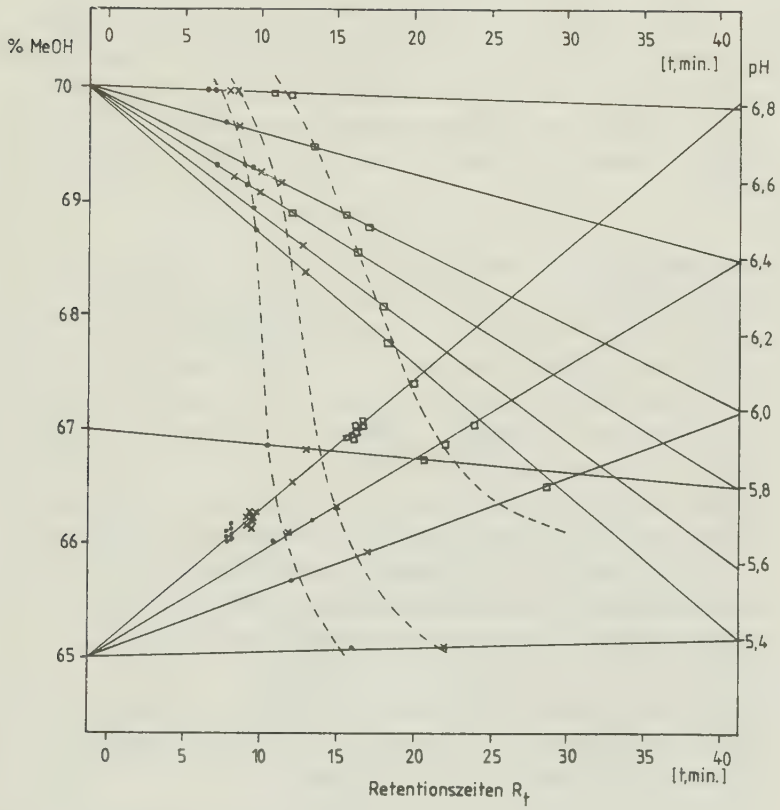


Abb. 24: Retentionszeiten von PGB_2 (•), LTB_4 (×) und LTC_4 (□) auf Nucleosil C_{18}, 5 µm (250 mm x 4,6 mm) in Abhängigkeit vom pH-Wert (rechte Ordinate) und vom Methanolgehalt (linke Ordinate) eines isokratischen 3-Komponenten-Laufmittelsystems. Die Verbindungslinien zwischen den beiden Ordinaten geben die für den jeweiligen Lauf kennzeichnenden Chromatographiebedingungen an. Die unterbrochen gezeichneten Kurven stellen die empirisch bestimmten Elutionseigenschaften der drei Testsubstanzen bei beliebiger Laufmittelzusammensetzung dar.

und LTC_4 an einem gebräuchlichen Säulenmaterial (Nucleosil C_{18}, 5 µm) aufgezeigt werden.

Die wichtigsten Variablen sind im vorliegenden Beispiel der Methanol-Anteil und der durch Säure- bzw. Basenzusatz einstellbare pH-Wert des Laufmittels. Die Effekte, die durch Veränderung der einen oder beider Größen bewirkt werden, lassen sich aus den "Ursache-Wirkungs-Diagramm" Abb. 24 ablesen.

Bei steigendem Methanolgehalt und fast neutralem pH-Wert zeigten PGB_2, LTB_4 und LTC_4 gleichsinnig verkürzte Retentionszeiten. Der Bereich, innerhalb dessen die drei Testsubstanzen bei angemessener Dauer des Chromatogramms und ausreichender Auflösung getrennt werden konnten, reichte für das 5 µm-Nucleosil C_{18}-Material von pH 5,4 bis pH 7,0 und von 65% bis 70% Methanolanteil am Laufmittel. Der Einfluß, den der pH-Wert bzw. der organische Laufmittelanteil ausübten, war augenfällig. Die weniger ionisierbaren Moleküle PGB_2 und LTB_4 reagierten im Retentionsverhalten eher auf Änderungen des Methanolanteils, wohingegen die Retentionszeit von LTC_4 eher pH-abhängig war.

Als Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen wurden zwei Laufmittelsysteme ausgewählt, die den Diagonalen des "Ursache-Wirkungs-Diagramms" entsprachen. Die Chromatogramme sind in Abb. 25 dargestellt.

Im Chromatogramm A (Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/0,1 v/v/v und pH 5,4) war die Grundlinientrennung aller drei Komponenten erreicht, der Peak von LTC_4 stellte sich jedoch derart verbreitert dar, daß eine Halbwertsbreite (Breite der Peaks in halber Höhe zwischen den Wendetangenten) nicht mehr korrekt zu messen war (mangelnde Peakschärfe). Umgekehrt waren im System B (Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 v/v/v und pH 6,8) alle Bedingungen für eine exakte Peakintegration erfüllt.

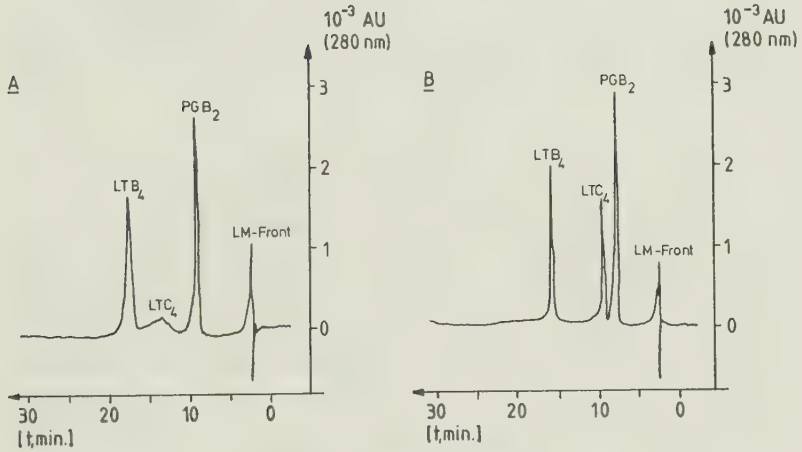


Abb. 25: Trennung von Prostaglandin B_2 (PBG_2), Leukotrien B_4 (LTB_4) und Leukotrien C_4 (LTC_4) mit
System A: Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/0,1 pH 5,4 und
System B: Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 pH 6,8.
Säule: Nucleosil C_{18}, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm, Fluß 1,0 ml/min. .
Detektion bei 0,01 AU Empfindlichkeit und λ = 280 nm.
Papiervorschub: 2 mm/min. .

In Fortsetzung der Ausführungen im Abschnitt 3.1.4. über die Probenextraktion bewirkte der Einsatz von Butylamin als Gegenion für die Ionenpaar-Reverse Phase-Chromatographie im neutralen bis sauren Milieu eine Verlängerung der Retentionszeiten von mäßig apolaren Komponenten mit anionischen Ladungsüberschuß. Gleichzeitig wurden unerwünschte unspezifische Wechselwirkungen mit Oberflächenadsorptionsstellen der Festphase vermindert und somit eine Verbesserung der Trennleistung erzielt (Abb. 26).

Mit zunehmender Konzentration von Butylamin im Laufmittel verbesserte sich die Auflösung zusehends. Allerdings ge-

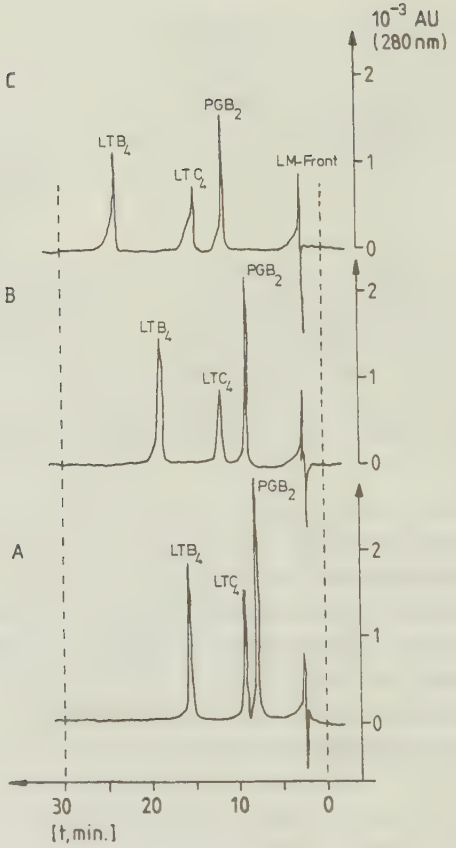


Abb. 26: Einfluß von Butylamin auf die Retentionszeiten von PGB_2, LTB_4 und LTC_4.

Laufmittel: Methanol/Wasser/Essigsäure 65/35/0,1 pH 6,8.

System A: 1 mM Butylamin.

System B: 2,5 mM Butylamin.

System C: 5 mM Butylamin.

Säule: Nucleosil C_{18}, 5 µm, 250 x 4,6 mm; Fluß 1,0 ml/min. .

Detektion bei 0,01 AU Empfindlichkeit und λ = 280 nm.

Papiervorschub: 2 mm/min. .

schah dies auf Kosten der Peakschärfe, vor allem bei LTC_4. So mußte im Hinblick auf eine akzeptable Detektionsgrenze und eine ökonomische Analysenzeit ein Kompromiß gefunden werden, wobei für das in Abb. 26 bezeichnete Trennsystem ein Butylaminzusatz von 1 - 2,5 mM zum Laufmittel in Frage kam.

Der Einsatz von Butylamin hatte einen weiteren Vorteil. Bei zahlreichen Säulenmaterialien, die erstmals benutzt oder die nach längerer Lagerung reaktiviert wurden, trat das Phänomen auf, daß zunächst eine ganze Serie von Chromatogrammen notwendig war, bis bestimmte Substanzen wieder zuverlässig und im gewohnten Umfang detektiert werden konnten. Die stationäre Phase mußte zunächst mit diesen Verbindungen aufgesättigt werden, was zeitaufwendig und kostspielig sein konnte. Durch den Zusatz von Laufmitteladditiven konnten diese Absorptionseffekte weitgehend ausgeschaltet werden. Dabei war Butylamin gegenüber EDTA, Pic A (Tetrabutylammoniumphosphat) oder Säurezusätzen (Phosphorsäure) insofern der Vorzug zu geben, als diese Substanz leicht flüchtig war (Probeneinengung) und bei Zunahme des organischen Laufmittelanteils im Verlauf eines Gradienten nicht zur Ausfällung von Salzen führte (Schädigung von Pumpen, Trennsäulen, Detektorzelle, Ventilen).

Die Problematik der Aufsättigung von HPLC-Säulen mit Lipoxygenase-Produkten sowie die Verwendung komplexer Laufmittelgemische und -additive konnte mit Hilfe von nachsilanisiertem ODS-Silica-Packungsmaterial (endcapping) weitgehend entschärft werden. So gelang es, ohne spezielle Konditionierung mit einer unbenutzten anaytischen Säule, die mit Spherisorb ODS II, 5 µm gefüllt war, in einem isokratischen Lauf unter Verwendung eines Methanol/Wasser/Essigsäure-Gemisches das in Abb. 27 gezeigte Chromatogramm aufzuzeichnen.

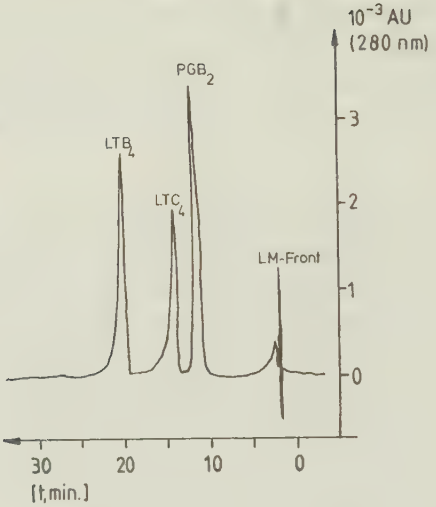


Abb. 27: Trennung von PGB$_2$, LTB$_4$ und LTC$_4$ mit Methanol/Wasser/Essigsäure 70/30/0,1 pH 5,0. Säule: Spherisorb ODS II, 5 µm, 250 x 4,6 mm; Fluß 1 ml/min. . Detektion bei 0,01 AU Empfindlichkeit und λ = 280 nm. Papiervorschub: 2mm/min. .

Aufgrund der eindeutig determinierten Oberflächenfunktionen dieser nachsilanisierten Festphase waren Trennprobleme zwischen isomeren Substanzen aus der Gruppe der Leukotriene und ihren Metaboliten eher lösbar als mit anderen versuchsweise eingesetzten Säulenmaterialien. Dies betraf vor allem LTB$_4$ und weitere Dihydroxy-Eicosatetraensäuren, die cis- und trans-Isomere und die Sulfoxide der Leukotriene. Weiter gelang es, die Detektionsgrenzen von Standards auf weniger als 1 ng zu senken, was gegenüber Literaturwerten mit herkömmlichen ODS-Silica-Materialien einer deutlichen Verbesserung entsprach.

Die Ergebnisse, die bei der Auftrennung von Reinsubstanzen, die in Laufmittel gelöst waren, erzielt wurden, konn-

ten jedoch nicht ohne weiteres auf die Methodenentwicklung zur weiteren Aufreinigung von vorextrahierten Urinproben mit der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie übertragen werden. Trotz Vorbehandlung des Urins mit Einmal-Trennsäulen eluierte unmittelbar im Anschluß an die Laufmittelfront ein ausgeprägter Schmutzpeak, der gesuchte Probensubstanzen mit kurzen Retentionszeiten vollständig überdecken konnte (Abb. 28). Auch durch Verminderung des organischen Laufmittelanteils, Absenkung des pH-Wertes und Erhöhung der Konzentration des Ionenpaar-Reagenzes zur Verlängerung des Chromatogrammablaufs war in einem isokratischen System die Abtrennung des Frontpeaks nicht möglich. Zum anderen war davon auszugehen, daß sich Verunreinigungen aus den Proben zunehmend auf der HPLC-Säule anreichern und sie binnen kurzem unbrauchbar machen würden, was aufwendige Verfahren zur Säulenreinigung und Rekonditionierung mit sich gebracht hätte.

Deshalb wurde ein Gradientenprogramm erarbeitet, das auf den Laufmitteln:
A: Methanol/Wasser/Essigsäure 60/40/0,1 pH 6,8 und
B: Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 pH 6,8
basierte. Im ersten isokratischen Abschnitt des Chromatogramms (0 - 15 Minuten) erfolgte die Abtrennung polarer Störfaktoren, im zweiten Abschnitt (20 - 30 Minuten) eluierten apolare Verbindungen, abschließend (35 - 45 Minuten) wurde die HPLC-Säule auf die Ausgangsbedingungen zurückgeführt (Abb. 29). In den Übergangsphasen (15 - 20 Minuten und 30 - 35 Minuten) wurden die Anteile beider Laufmittel kontinuierlich den Bedingungen des nachfolgenden Chromatogrammabschnitts angepaßt (Gradient Nr. 6).

Wie aus Abb. 29 zu ersehen ist, schwankte die Grundlinie bei einer Wellenlänge von λ = 280 nm infolge unterschiedlicher Absorption in Abhängigkeit vom aktuellen Methanolgehalt des Eluenten beträchtlich. Dadurch wurde zusätz-

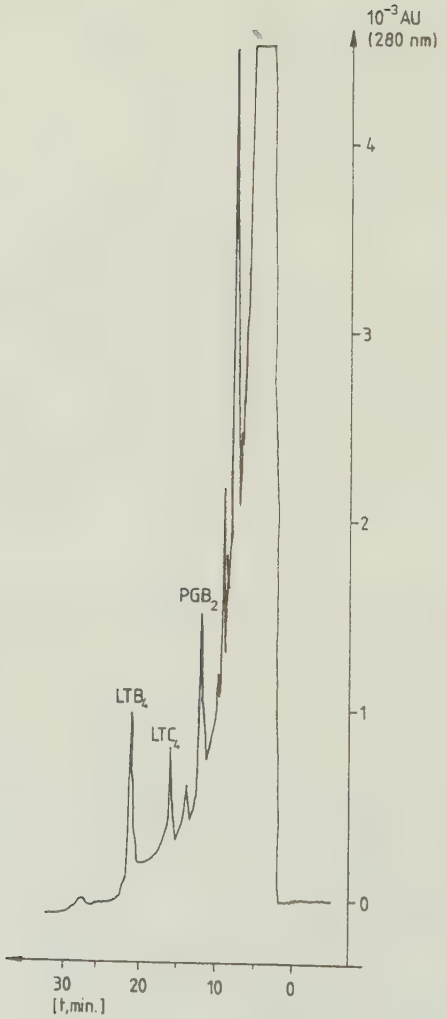


Abb. 28: Chromatogramm einer vorgereinigten Urinprobe. Zusatz von PGB_2, LTB_4 und LTC_4.
Trennbedingungen und Säulenmaterial wie bei Abb. 27.
Detektion jedoch bei 0,05 AU Empfindlichkeit und λ= 280 nm.

lich zu den Überlagerungen des Chromatogramms mit Störfaktoren aus der Probenmatrix (s. Abb. 31) die Identifikation von Substanzpeaks und deren Auswertung durch maschinelle Integration erschwert oder gänzlich unmöglich.

Der ursprüngliche Ansatz, PGB_2 als internen Standard zur Berechnung der Recovery des Extraktions- und Aufreinigungs-Verfahrens für LTB_4 und LTC_4 aus Urin zu verwenden, mußte deshalb aufgegeben werden. Stattdessen war es nicht zu umgehen, bei jeder Extraktion parallele Kontrollproben mit definierten Mengen an tritiiertem LTB_4 und LTC_4 mitlaufen zu lassen. Um den deswegen gestiegenen Aufwand in der Routineaufarbeitung zu begrenzen, wurde pro Ansatz (10 Proben) eine Probe entsprechend markiert.

Da die aus menschlichem Urin extrahierten Leukotriene nicht in der Größenordnung von UV-spektroskopisch detektierbaren Mengen vorlagen, mußte die Auswahl der zu sammelnden Abschnitte des HPLC-Chromatogramms von Proben (Einstellung der "Fenster" für LTB_4 und LTC_4) auf indirekte Weise erfolgen. Durch Injektion von markiertem LTB_4 und LTC_4 sowie durch Auswertung der Radioaktivität pro Ein-Minuten-Fraktion konnte die Elution der beiden Substanzen unabhängig von der UV-Detektion verfolgt werden. Kleine Peaks und Schultern, die anhand des UV-Chromatogramms in fraglichem Zusammenhang zu LTB_4 und LTC_4 standen, konnten so eindeutig zugeordnet werden (s. Abb. 31). Als weiterer Vorteil erwies sich, daß durch Addition der in einem Peak enthaltenen Counts eine einfache Peak-Integration möglich war.

Zur korrekten Einstellung der "Elutionsfenster" für LTB_4 und LTC_4 war der Weg zwischen Detektorzelle, Schaltventil und Auslaß ins Sammelgefäß zu berücksichtigen und die entsprechende Verzögerung in das Steuerprogramm für

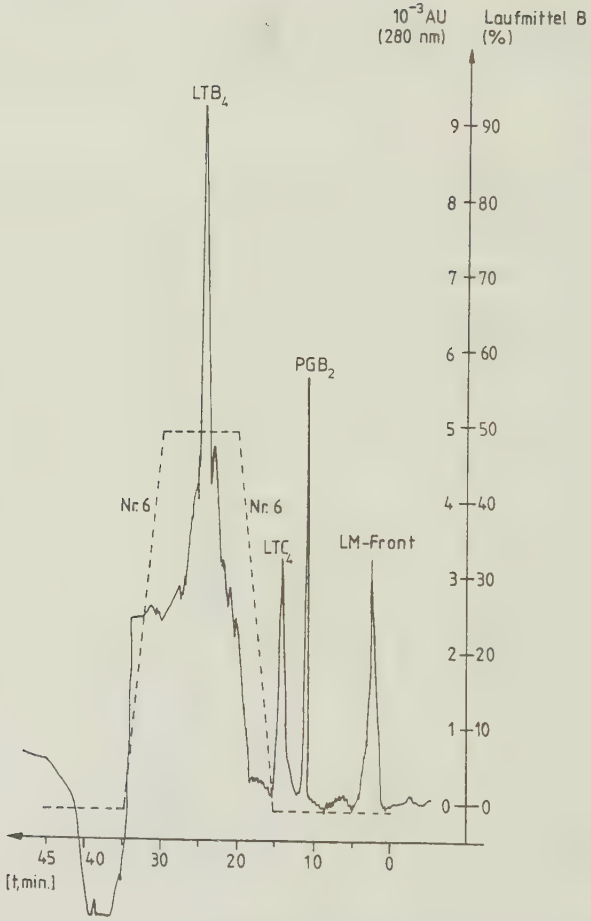


Abb. 29: Gradientensystem zur Abtrennung von PGB_2, LTB_4 und LTC_4 aus Urin, hier Injektion von Reinsubstanzen in Laufmittel.
Laufmittel A: Methanol/Wasser/Essigsäure 60/40/0,1 pH 6,8.
Laufmittel B: Methanol/Wasser/Essigsäure 85/15/0,1 pH 6,8.
Zumischung von Laufmittel B in % (unterbrochene Linie) mit Gradient Nr. 6 (linear).
Säule: Spherisorb ODS II, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm; Fluß 1ml/min. .
Detektion bei 0,01 AU Empfindlichkeit und λ = 280 nm.
Papiervorschub: 2 mm/min. .

die Schaltfunktionen der automatisierten HPLC-Anlage aufzunehmen. Da das Herausgreifen der Fraktionen von LTB_4 und LTC_4 aus Chromatogrammen von Urinproben also ohne feste Zuordnung zu optisch detektierbaren Peaks erfolgte, wurde die korrekte "Fenstereinstellung" regelmäßig überprüft.

Nach Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie mit Spherisorb ODS II lag die Recovery der Fraktionen von LTB_4 und LTC_4 gemessen mit tritiierten Reinsubstanzen bei 95%. Erfolgte die entsprechende Abtrennung aus extrahierten Urinproben, dann stieg der Verlust durch HPLC-Aufreinigung für LTB_4 auf 7% und der für LTC_4 auf 11%. Die Daten der vorausgenden Schritte zur Extraktion von LTB_4 und LTC_4 aus Urin sind in Abb. 30 zusammengefaßt.

Die Aufreinigung mit Einmal-Trennsäulen brachte für beide Substanzen die größten Verluste, wobei insgesamt 77%±12% an LTB_4 und 59%±15% an LTC_4 ($\bar{x}\pm SD$, n = 50) bezogen auf die Ausgangsmengen zur Bestimmung mit den beiden spezifischen Radioimmunoassays zur Verfügung standen.

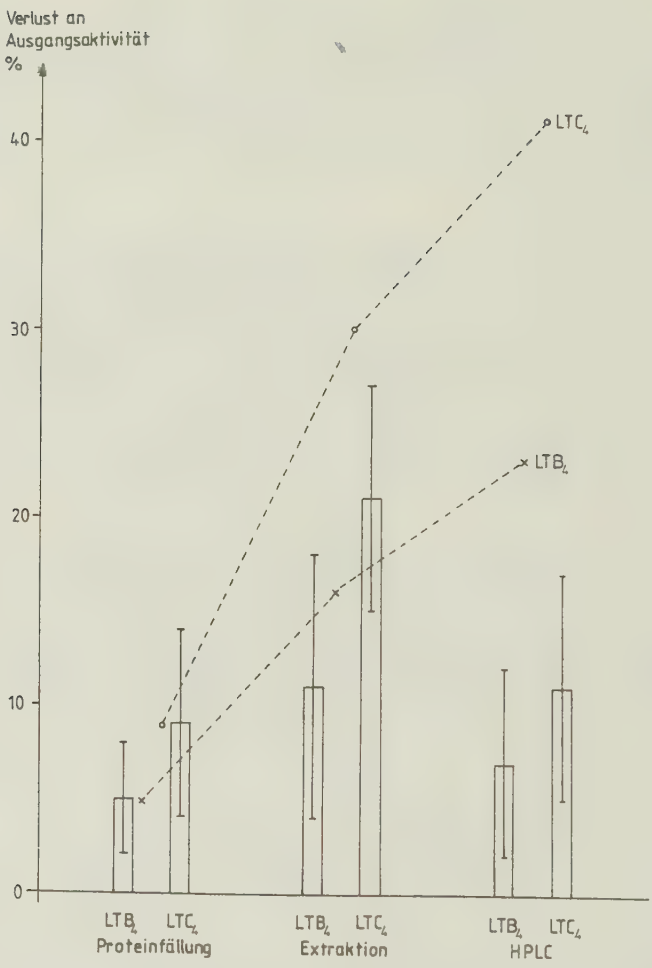


Abb. 30: Kumulativwerte des Verlusts an Ausgangsaktivität von LTB_4 (×) und LTC_4 (o) im Verlauf der Aufreinigung bzw. bei den einzelnen Aufreinigungsschritten (Säulendarstellung) aus Urin ($\bar{x}\pm SD$, n = 50).

3.2. Analytik von Biopsieproben

Es wurde angestrebt, die wichtigsten Metabolite aus dem Inkubationsansatz im gleichen Umfang extrahieren zu können. Dichlormethan als organische Phase lieferte nach HPLC-Fraktionierung Recoveries von 71% (LTB_4), 75% (5-HETE), 73% (12-HETE und 15-HETE) sowie 76% (Arachidonsäure). Für LTC_4 waren die Ergebnisse weniger zufriedenstellend (61%).

Die einzelnen Fraktionen wurden nach HPLC-Trennung anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert (Abb. 5). Mit Hilfe der pro Substanz erhaltenen Menge an Radioaktivität konnten die relativen Umbauraten aus Arachidonsäure zu den verschiedenen Produkten gemessen werden. Insgesamt gesehen wurden im Durchschnitt nur 4,6% (Bereich 0,5% bis 15%) des angebotenen Substrats durch die Lipoxygenase umgesetzt.

Da nur für LTB_4 und LTC_4 spezifische Antikörper zur Verfügung standen, wurden entsprechend den Modifikationen im Abschnitt 2.9. diese beiden Metabolite in den extrahierten Inkubationsansätzen ohne markierte Arachidonsäure gemessen und unter Berücksichtigung der Wiederfindungsraten auf mg Protein bezogen.

Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Menge an Biopsiematerial mußte auf eine Auftrennung und Messung der Lipoxygenaseaktivität mittels Dünnschicht-Chromatographie verzichtet werden.

3.3. Messungen mit spezifischen Radioimmunoassays

Die Detektionsgrenzen lagen bei den in dieser Arbeit benutzten radioimmunologischen Methoden für LTB_4 und LTC_4 bei 10 pg/Test. Die obere Grenze des Meßbereichs, der noch sicher erfaßt wurde, lag bei 1600 pg/Test. Eine Steigerung der Empfindlichkeit war durch Verkleinerung der Testvolumina, durch Verringerung der Menge an zugesetztem Label (< 2000 cpm) und durch Erhöhung der Menge an Aktivkohle zur Präzipitation des nicht gebundenen Tracers möglich.

Die Reproduzierbarkeit und die Präzision der Messungen für beide Leukotriene ließen sich aus den Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden ablesen, die durchweg zwischen $0{,}95 \leq r \leq 0{,}99$ lagen. Die Steigungskoeffizienten der Logit-Log-Darstelllung als Maß für die Diskriminationsfähigkeit zwischen zwei Meßpunkten betrugen für LTB_4 zwischen -2,50 und -1,91 sowie für LTC_4 zwischen -3,07 und -2,19.

Um zu zeigen, daß mit Hilfe der beiden spezifischen Radioimmunoassays nach der beschriebenen aufwendigen Probenextraktion tatsächlich immunreaktives LTB_4 und LTC_4 bestimmt werden konnten, wurden bekannte Mengen beider Substanzen aus Urin extrahiert und chromatographiert. In jeder Ein-Minuten-Fraktion wurde dann der Gehalt an LTB_4 bzw. LTC_4 radioimmunologisch gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 31 dargestellt und stimmte mit den auf gleichem Wege erhaltenen Resultaten der UV-Detektion und der Bestimmung der Radioaktivität im Eluat überein. Wurden alle Fraktionen, die innerhalb der "Fenster" für LTB_4 bzw. LTC_4 eluierten, als Gesamtheit im jeweiligen Radioimmunoassay gemessen, dann ließ sich die unter Berücksichtigung der Recovery zu erwartende Substanzmenge wiederfinden. Auf das Ergebnis hatte die getrennte oder ge-

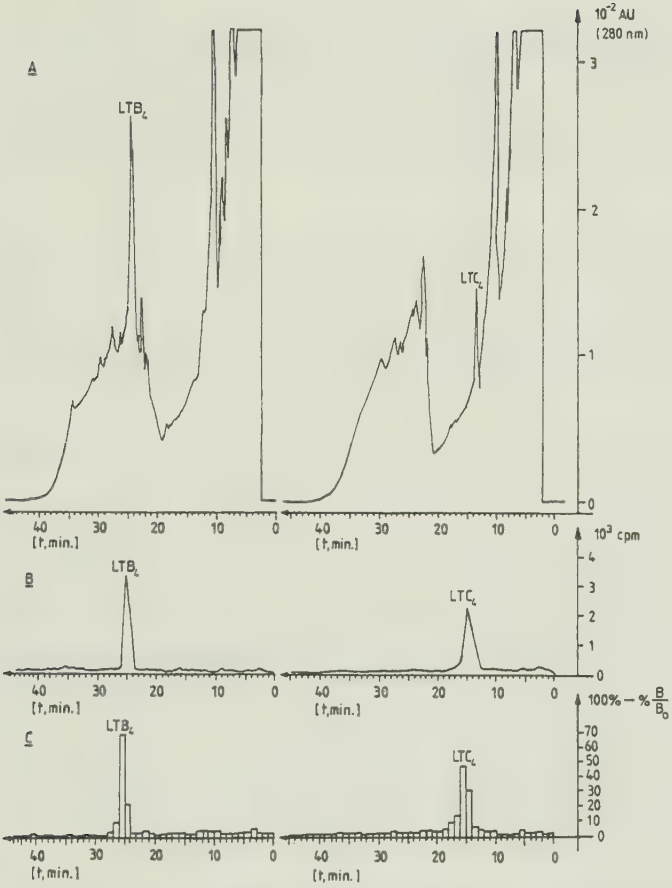


Abb. 31: A: UV-Chromatogramme von Urinen nach Probenaufarbeitung, die mit LTB_4 und LTC_4 versetzt wurden.

B: Eluationsprofil der Radioaktivität von ^3H-LTB_4 bzw. ^3H-LTC_4.

C: Immunreaktivität des HPLC-Chromatogramms (100%-proz. Nettobindung).

Gradientenprogramm, Laufmittel A und B, Säule und Vorsäule wie in Abb. 29.

Detektion bei 0,05 AU Empfindlichkeit und λ = 280 nm.

Papiervorschub: 2 mm/min. .

meinsame Zugabe beider Leukotriene zur biologischen Probe keinen Einfluß. Umgekehrt bestand keinerlei Kreuzreaktivität zwischen den extrahierten Fraktionen von LTB_4 und LTC_4, so daß die Bedeutung der Polyen-Struktur, der C_{12}-OH-Gruppe und des Glutathion-Restes für die Immunreaktivität deutlich wurde.

Bei der Extraktion von Wasser oder von Phosphatpuffer in analoger Weise zu den Urinproben ließen sich in einigen Fällen Spuren an LTB_4 und LTC_4 nachweisen. Es handelte sich dabei um Mengen im Bereich der Detektionsgrenze, die als Grundrauschen akzeptiert wurden.

Bei der Untersuchung von Urin, der im Wasserbad bei 37 °C inkubiert wurde (biochemischer Abbau von endogenen Leukotrienen) bzw. dessen Gehalt an Leukotrienen durch Aktivkohle gebunden wurde, waren ähnliche oder geringfügig höhere Mengen immunreaktiver Substanzen zu finden. Nicht vorbehandelte Urine von Normalprobanden und von nierentransplantierten Patienten wiesen demgegenüber Meßwerte auf, die im mittleren bis oberen Bereich der Eichkurve lagen (s. Abschnitt 4), so daß Einflüsse, die möglicherweise von Materialien und Reagenzien der Probenaufarbeitung stammten, eine untergeordnete Rolle spielten ("Blank-Effekt").

Wurden Proben in einem bestimmten Verhältnis verdünnt, konnte eine Proportionalität bis in die Nähe der Erfassungsgrenze der Radioimmunoassays nachgewiesen werden. Wurde das Doppelte oder ein Mehrfaches der routinemäßig eingesetzten Urinmenge (10 ml) bearbeitet, dann stieg trotz der aufwendigen Extraktionsmethode der Anteil an Störfaktoren und Farbpigmenten, die nicht entfernt werden konnten, in einem Ausmaß an, daß radioimmunologisch zunehmend weniger Leukotriene gefunden wurden als erwartet. Dieses Phänomen spielte vor allem

beim LTC_4-Assay eine Rolle. Vermutlich traten wie bereits angedeutet, die nicht extrahierbaren Substanzen mit dem Antikörper in eine Wechselwirkung, die das Bindungsverhalten gegenüber LTC_4 oder speziell ^3H-LTC_4 beeinflußten.

3.4. Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens

Eine Form der Qualitätskontrolle war durch den Vergleich der Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizienten der einzelnen Standardkurven gegeben (siehe Abschnitt 3.3.). Damit wurden allerdings mehr die radioimmunologischen Messungen im engerem Sinne erfaßt. Die Güte des Extraktionsverfahrens ließ sich, wie bereits erwähnt, überprüfen, indem Patientenproben mit tritiiertem LTB_4 bzw. LTC_4 versetzt wurden, um die Ausbeute nach Extraktion mit HPLC-Aufreinigung mit Hilfe von Flüssig-Szintillations-Messungen zu bestimmen. Zum anderen aber bestand die Möglichkeit, bei jedem Extraktionsansatz fixe Standards mitzuführen, die parallel zu den Proben bearbeitet wurden und im Fall von Abweichungen zu bekannten Daten einen Warnhinweis lieferten.

Dazu wurden Punkte von der Standardkurve ausgewählt, die etwa die Hälfte der Counts des Leerwerts aufwiesen. Für den LTB_4-Assay wurden dementsprechend Eichwerte mit einem endgültigen Gehalt von 100 pg/Ansatz vorgegeben, beim LTC_4-Assay betrug die Referenzmarke 200 pg/Ansatz. Die Menge, die dem Urin zugesetzt wurde (Spike), erhöhte sich natürlich um den Betrag, der erfahrungsgemäß durchschnittlich im Verlauf der üblichen Probenaufarbeitung verloren ging.

Daten, die im zeitlichen Ablauf die Qualität des Extraktionsverfahrens kontrollierten (inter-assay-Reproduzierbarkeit), überschritten bei der Bestimmung von LTB_4 eine Toleranzgrenze von ±15% Abweichung vom Mittelwert in der Regel nicht. Dagegen wies der LTC_4-Assay im Verlauf Schwankungen größeren Ausmaßes auf (Tab. 6).

Wurden mehrere Doppelbestimmungen der genannten Standardwerte nebeneinander ausgeführt (intra-assay-Reproduzierbarkeit), dann blieb die Summe aller Abweichungen für beide Leukotriene unter ±15% des jeweiligen Mittelwertes. Die

Tab. 6: Intra-assay und inter-assay-Reproduzierbarkeit bei der Extraktion von LTB_4 und LTC_4 aus Urin sowie der anschließenden radioimmunologischen Bestimmung.

	LTB_4	Recovery LTB_4	LTC_4	Recovery LTC_4
Referenzwert aus der Eichgeraden	100 ng/Test		200 ng/Test	
Intra-assay-Reproduzierbarkeit (n=20, $\bar{x}\pm SD$)	107±13ng/Test	82%	213±31ng/Test	62%
Inter-assay-Reproduzierbarkeit (n=20, $\bar{x}\pm SD$)	103±15ng/Test	78%	222±42ng/Test	65%

Mittelwerte beider Versuchsreihen wiederum lagen mengenmäßig etwas oberhalb der aus der Eichkurve ausgewählten Punkte, so daß die Gesamtrecoveries der radioimmunologischen Bestimmungen besser als diejenigen waren, die aufgrund der Flüssigszintillations-Messung radioaktiv markierter Proben nach HPLC bestimmt wurden.

Eine wichtige Absicherung sowohl der Probenaufarbeitung als auch der Meßmethode bestand in der Erstellung einer Eichgerade in biologischem Material. Dazu wurden für LTB_4 und LTC_4 zu jedem Punkt der Standardkurve vier Parallelwerte vorgesehen und mit den entsprechenden Mengen an Reinsubstanz zuzüglich des erwarteten Verlustes bei der Aufreinigung entsprechend dem vorstehend Gesagten versetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 32 dargestellt.

Nach Logit-Log-Transformation erhielt man folgende Gleichungen der Eichgeraden:

LTB_4 ($y = -2{,}35x + 4{,}12$; $r = 0{,}88$)

und LTC_4 ($y = -2{,}13x + 3{,}87$; $r = 0{,}81$).

Dieses Ergebnis für die Extraktion beider Leukotriene in unterschiedlichen Konzentrationen aus Urin zeigte gute Übereinstimmung mit bereits erzielten Resultaten. Erwartungsgemäß war die Streuung der Meßwerte größer und deshalb die Korrelation niedriger als bei den Eichgeraden mit Standards. Außerdem war zu sehen, daß im unteren Teil der Standardkurve in biologischem Material nach Extraktion die Empfindlichkeit abnahm.

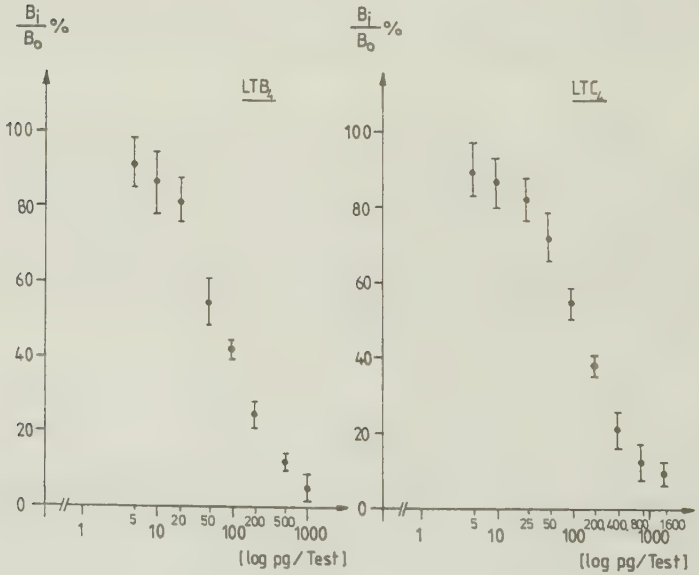


Abb. 32: Standardkurven von LTB_4 und LTC_4 nach Extraktion aus Urin ($n = 4$ pro Meßpunkt, $\bar{x} \pm SD$).

3.5. Stabilität und Metabolismus von LTB_4 und LTC_4

3.5.1. Stabilität in Lösungsmitteln

Eigenen Erfahrungen zufolge ergaben sich jedoch in Stammlösungen (0,32 mM LTB_4 bzw. LTC_4) trotz Lagerung bei -20 °C und mehrmaliger Erwärmung auf Raumtemperatur keine Anhaltspunkte für eine nennenswerte Zersetzung. LTB_4 chromatographierte als einheitlicher Peak und unterschied sich hinsichtlich Retentionsverhalten und Peakform nicht von den Daten, die unmittelbar nach Eintreffen des Materials erstellt wurden. Verdünnungen von LTB_4 konnten ohne weitere Aufreinigung als Standardsubstanzen in den spezifischen Radioimmunoassay (s. Abschnitt 2.9. und 3.3.) eingesetzt werden, ohne daß ein Verlust an Sensitivität oder Spezifität zu verzeichnen gewesen wäre. Zu erwähnen ist noch, daß LTB_4 nach einem Jahr gaschromatographisch-massenspektrometrisch als Reinsubstanz zu identifizieren war. Eine Umlagerung zum 11-trans-Isomer ließ sich mit keiner Methode feststellen.

Demgegenüber entstand unter gleichen Bedingungen aus der Reinsubstanz LTC_4 ein polares Produkt, das nach Ergebnissen der Reverse Phase-HPLC unmittelbar vor dem Hauptpeak eluierte und bei dem es sich um eines der in Abb. 33 aufgeführten Umlagerungsprodukte handelte, ohne daß in der vorliegenden Untersuchung exakte Strukturbeweise erbracht werden konnten.

Nach einem Jahr lag sein Anteil unter den Inhaltsstoffen der Stamm-Lösung bei weniger als 10%. Wurde LTC_4 jedoch in verdünnter Form (z.B. 1,6 µM) in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei Temperaturen um 4 °C aufbewahrt, dann stieg bereits nach einem Monat die Menge des LTC_4-Metabolites auf bis zu 30% an. In etwas kleinerem Rahmen bewegte sich die Umlagerung zum 11-trans-Isomer, die nach

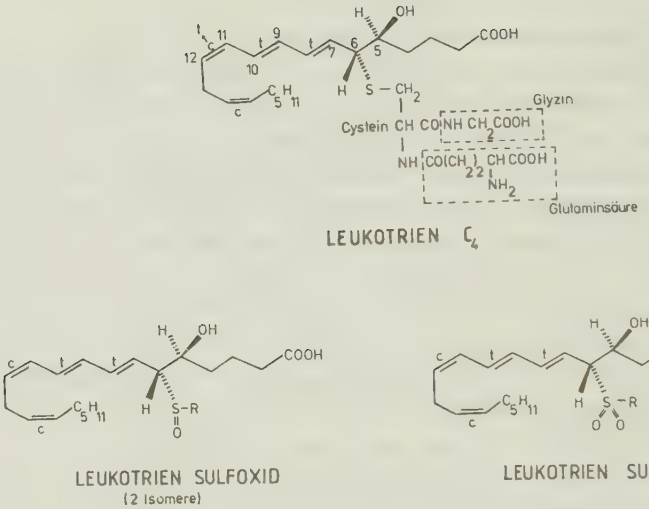


Abb. 33: Leukotrien C_4 und Umlagerungsprodukte durch chemische Instabilität der Reinsubstanz.
R = γ -Glutathionyl-Rest (173).

erfolgter Aufreinigung sofort neu einsetzte und sich bei einem Anteil von 25% 11-trans-LTC_4 einpendelte. Diese Tatsache machte eine wiederholte HPLC-Aufreinigung des Tracers für den LTC_4-Radioimmunoassay notwendig (Abb. 34)

3.5.2. Stabilität in biologischen Proben

Sämtliche Urinproben, die im Verlauf der Studie von Norma probanden und von nierentransplantierten Patienten gewonnen wurden, sind innerhalb eines Zeitraumes von dreieinha Monaten gesammelt worden. Die Probenaufarbeitung erfolgte in der Regel mit vier Monaten Abstand zum Entnahmedatum.

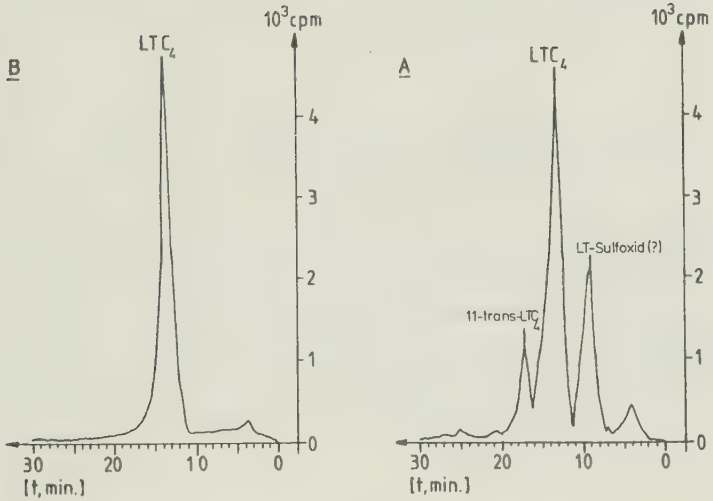


Abb. 34: RP-HPLC-Chromatogramm der Umlagerungsprodukte von LTC_4 in Phosphatpufferlösungen.
(Chromatographiebedingungen siehe Abschnitt 2.7.3.).
A: LTC_4 (1,6 µM) nach einmonatiger Lagerung in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bei 4 °C.
(54% LTC_4, 14% 11-trans-LTC_4, 22% LT-Sulfoxid).
B: Rechromatographie von LTC_4 nach Aufreinigung.

Um festzustellen, ob während der Probenlagerung trotz sofortiger Fixierung nach Miktion dennoch Umlagerungs- und Abbauvorgänge stattfanden, wurden einige Urinproben von nierengesunden und von nierentransplantierten Patienten mit markiertem und unmarkiertem LTB_4 bzw. LTC_4 versetzt. Ein Teil der Proben wurde nach 4 Monaten (Beginn der Probenaufarbeitung), ein zweiter Teil nach 8 Monaten (Abschluß der Arbeiten) auf Zerfallsprodukte untersucht. Dabei zeigte sich, daß LTB_4 die Lagerung von 8 Monaten in einem Medium aus Urin und Äthanol im Verhältnis von 1 : 3

bei - 20 °C völlig unbeschadet überstanden hatte. LTC_4 hingegen wurde zu jeweils ca. 5% in das 11-trans-Isomer bzw. in den unbekannten polaren Metaboliten umgewandelt.

3.5.3. Stabilität während der Probenaufarbeitung

Nach den Ergebnissen der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie zu urteilen, traten bei LTB_4 im Verlauf der Probenaufarbeitung keine Umlagerungs- oder Abbaureaktionen auf. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen kamen zu dem gleichen Ergebnis. Von LTC_4 isomerisierten 6 - 8% der Ausgangsmenge zu 11-trans-LTC_4. Weitere 4% wurden in Produkte umgewandelt, die hauptsächlich in Form eines polaren Metaboliten vor dem Peak der Reinsubstanz eluierten.

3.5.4. Metabolismus im Urin

Als vereinfachtes Modell zur Nachahmung der körpereigenen Vorgänge diente die in Abschnitt 2.13. beschriebene "künstliche Blase", in der LTB_4 und LTC_4 einzeln und getrennt m Spontanurin inkubiert wurden. Die Probenextraktion erfolg mit dem bekannten Verfahren, die Analytik wurde nach HPLC Auftrennung mittels β-Counting, Radioimmunoassay, UV-Spe trometrie und im Falle von LTB_4 mittels Gaschromatographi Massenspektrometrie durchgeführt.

Im denaturierten Urin (eine Stunde bei 60 °C vorbehandelt wurden LTB_4 und LTC_4 nach 3 Stunden Inkubation (37 °C, Ar gonatmosphäre, Dunkelheit) nahezu unverändert wiedergefun den. Von LTB_4 wurden knapp 7% der Ausgangsmenge entsprechend 70 ng LTB_4 pro 10 ml Urin zum 11-trans-Isomer umgelagert, bei LTC_4 fand der entsprechende Vorgang mit 12% des eingesetzten Materials entsprechend 120 ng pro 10 ml Urin statt. Zusätzlich fand sich noch ein polares Umlagerungsprodukt des Sulfidopeptid-Leukotriens, dessen Peak

im HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion, radioaktives Elutionsprofil) die gleiche Retentionszeit aufwies wie ein durch chemische Umlagerung entstandener unbekannter Metabolit (s. Abschnitt 3.5.1.). Umwandlungsprodukte, die mit der Laufmittelfront eluierten und damit eine komplette Degradation von Leukotrienen zu völlig polaren Substanzen wie z.B. Wasser angezeigt hätten, konnten nicht nachgewiesen werden. Radioimmunologische Messungen in den Einzelfraktionen der HPLC-Auftrennung eines Versuchsansatzes analog zu Abschnitt 3.3. (Immunchromatographie), der ausschließlich unmarkiertes LTB_4 und LTC_4 enthielt, bestätigte das genannte Resultat. Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie schließlich zeigte, daß nach dreistündiger Inkubation im Vergleich mit Reinsubstanzen tatsächlich authentisches LTB_4 vorlag.

Ein gegenüber diesen Kontrollversuchen teilweise verändertes Bild ergab sich, wenn markiertes und unmarkiertes LTB_4 und LTC_4 unter den gleichen Bedingungen wie oben in Spontanurin inkubiert wurden. Zunächst hatten die im Urin vorhandenen Zellen und löslichen Enzyme keinen Einfluß auf die Umsetzung von LTB_4 in andere Metabolite, die über das Ausmaß der im Kontrollversuch geschilderten Degradation hinausging. Demgegenüber kam es zu einer "Biokonversion" von LTC_4, die folgendermaßen zusammengefaßt werden kann (Abb. 35):

1) LTC_4 wurde zeitabhängig zunächst in LTD_4 und schließlich in LTE_4 überführt. Die Halbwertszeit für die Umsetzung von LTC_4 in LTD_4 betrug ca. 30 Minuten. Nach Ablauf von 22 Stunden (Ende des Experiments) blieben weniger als 10% der zu Versuchsbeginn eingesetzten Menge an LTC_4 nachweisbar.

2) Die maximale Konzentration von LTD_4 wurde nach zwei Stunden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lagen bereits mehr als zwei Drittel des ursprünglich vorhandenen

LTC_4 in Form von LTD_4 vor. Anschließend nahm die Menge an LTD_4 kontinuierlich bis auf fast Null ab.

3) Mit einer Verzögerung von einer halben Stunde begann die Umwandlung von LTD_4 in Form einer Asymptote zu LTE_4, die nach 22 Stunden weitgehend abgeschlossen war. Die Halbwertszeit dieser Reaktion betrug annähernd sechs Stunden.

4) Ein Abbau von LTC_4 bis zu Wasser oder eine Umwandlung in andere stark polare Degradationsprodukte wurde nicht beobachtet. Dafür zeigte sich mit zunehmender Versuchsdauer ein Anwachsen der Sulfoxide, was besonders deutlich bei LTE_4 am Schluß des Experiments ausgeprägt war. Hier lagen schließlich gleich große Mengen an LTE_4 und LTE_4-Sulfoxid vor.

Die in Abb. 35 dargestellten Resultate basierten auf 12 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Urinen weiblicher (n=5) und männlicher (n=7) Versuchspersonen. Der Menge an Radioaktivität in den Einzelfraktionen des HPLC-Chromatogramms wurden die integrierten Flächenwerte der Peaks von LTC_4, D_4 und E_4 gegenübergestellt, die durch UV-Detektion registriert wurden. Messungen in Versuchsansätzen, die LTC_4 im radioimmunologisch erfaßbaren Bereich enthielten, unterstützten die Annahme, daß diese Substanz zu anderen Sulfidopeptid-Leukotrienen umgebaut wurde. In den entsprechenden Fraktionen des HPLC-Chromatogramms war eine rasche Abnahme an immunreaktivem LTC_4 nachweisbar. Zu den Elutionszeiten von LTD_4 bzw. LTE_4 fanden sich je nach Kreuzreaktivität des LTC_4-RIA (55% für LTD_4 bzw. 9% für LTE_4) 2 und 4 Stunden nach Versuchsbeginn bzw. gegen Ende der Inkubation Substanzen, die eine Bindung mit dem Antikörper eingingen. Mit Hilfe des LTB_4-RIA ließ sich eine Metaboli-

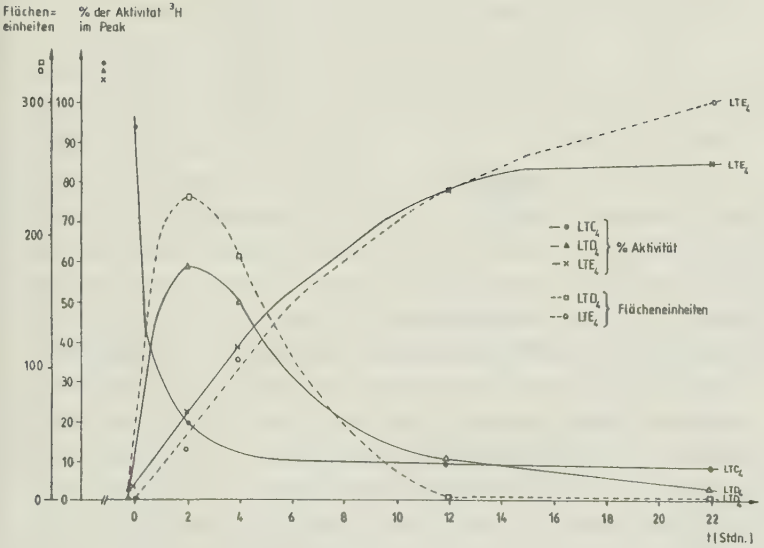


Abb. 35: Biokonversion von LTC_4 zu LTD_4 und LTE_4 in Spontanurin bei 37 °C, Argonatmosphäre, Dunkelheit. Umsetzung von radioaktivem Material (durchgezogene Linie, linke Ordinate) und .
nicht markiertem Material (unterbrochene Linie, rechte Ordinate, n=12 pro Meßpunkt.

sierung von LTB_4 ausschließen. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen zeigten ebenfalls, daß LTB_4 unverändert blieb.

4. Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin

4.1. Gruppe der Normalprobanden (Kontrollgruppe)

4.1.1. Einzeldaten

Von jedem der 10 gesunden Freiwilligen lagen pro Versuchstag 2 Meßwerte bezüglich der Tagesausscheidung an Leukotrien B_4 und C_4 vor, die mit spezifischen Radioimmunoassays bestimmt wurden. Zusätzlich ließ sich aus der mittleren täglichen Ausscheidung der beiden Metabolite des Lipoxygenase-Stoffwechselweges ein Quotient bilden (LTB_4/LTC_4). Dieses mengenmäßige Verhältnis konnte als parameterfreies Merkmal zur Charakterisierung eines Probanden, oder wie später noch zu sehen sein wird, auch einer ganzen Gruppe von Versuchsteilnehmern verwertet werden. Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die wesentlichen Daten, die für die Kontrollgruppe von Bedeutung waren.

Tab. 7: Daten zur Gruppe der Normalprobanden. Tägliche Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 im Urin in Beziehung zum Serumkreatinin.

Proband Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Kreatinin (mg/dl)	ng LTB_4/Tag $\bar{x}$±SD	ng LTC_4/Tag $\bar{x}$±Sd	LTB_4/LTC_4 $\bar{x}$±SD
1	♀	42	0,8	95± 8	24± 7	4,3± 1,3
2	♀	50	1,0	160±11	35±18	5,3± 2,4
3	♀	49	1,1	213± 8	8± 4	31,7±20,4
4	♀	42	0,9	161±17	41±25	5,0± 2,7
5	♀	45	1,2	270±28	28±15	12,1± 7,1
6	♂	25	0,9	140± 9	24± 6	6,1± 2,0
7	♂	27	1,3	271±17	25±13	13,4± 5,8
8	♂	30	1,0	138±16	41± 9	3,5± 1,1
9	♂	24	1,1	197± 6	25± 5	8,1± 1,9
10	♂	31	0,9	168±10	35± 8	5,0± 2,1
				$\bar{x}$±SD: 181±56	$\bar{y}$±SD:28±14	$\bar{z}$±SD: 9,5±10,2

Die 5 weiblichen Probanden waren durchschnittlich 47 Jahre alt, die 5 männlichen 27 Jahre (mittl. Gesamtalter 37 Jahre). Mit 1300 ml pro Tag lag das Volumen des 24-Stundenurins der männlichen Versuchsteilnehmer um 150 ml über dem der Frauen. Hinsichtlich der täglichen Urin-Ausscheidung an Leukotrien B_4 und C_4 differierten beide Untergruppen des Normalkollektivs im Mittel nur geringfügig voneinander (Frauen: 180 ng LTB_4/Tag bzw. 27 ng LTC_4/Tag; Männer: 183 ng LTB_4/Tag bzw. 30 ng LTC_4/Tag). Gleiches gilt für die Mittelwerte der Quotienten aus LTB_4 und LTC_4, sofern Probandin Nr. 3 nicht berücksichtigt wird (Frauen: LTB_4/LTC_4 = 6,7; Männer: LTB_4/LTC_4 = 7,2).

Zum Vergleich der Leukotrienausscheidung im Urin zwischen gesunden Freiwilligen und nierentransplantierten Patienten der chronischen Phase empfiehlt sich eine Normierung der Meßwerte auf das Serumkreatinin (Tab. 8).

Tab. 8 Gemittelte Daten für die Kontrollgruppe (Kreatininbezogene Leukotrienausscheidung), $\bar{x}\pm SD$, n = jeweils 5.

	ng LTB_4/Tag / mg Kreatinin/dl	ng LTC_4/Tag / mg Kreatinin/dl
Frauen	175±40	28±15
Männer	174±28	29±9

4.1.2. Homogenität der Gruppe der Normalprobanden

Um eine abgesicherte Aussage über die vermutete Einheitlichkeit der Meßergebnisse(Normalwerte) zu erhalten, wurde ein Friedman-Test zur Prüfung auf eine Grundgesamtheit durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine zweifache

parameterfreie Rangvarianzanalyse für mehrere verbundene Stichproben. Damit konnte zum einen festgestellt werden, wie bei der gewählten Versuchsanordnung die Meßwerte der gesamten Gruppe auf die 3 Versuchstage verteilt waren und ob Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden vorlagen.

Im einzelnen zeigte sich, daß die Schwankungen in der täglichen Produktion von Leukotrienen bei den Teilnehmern der Kontrollgruppe nicht einem bestimmten Trend folgten, sondern daß die gewonnenen Daten pro Versuchstag einander gleichwertig waren:

$[\chi^2_R(LTB_4) = 0,\ \chi^2_R(LTC_4) = 0{,}2,\ \chi^2_R(LTB_4/LTC_4) = 1{,}4;$
Prüfgröße $\hat{\chi}^2_R = 9{,}6$ für $K = 3$, $n = 10$ und $p = 0{,}01]$.

Darüber hinaus konnte dies als Hinweis dafür aufgefaßt werden, daß sich die Methodik der Probenaufreinigung und das radioimmunologische Meßverfahren als hinreichend reproduzierbar erwies, was schon wegen der in der Regel geringen Abweichung der Doppelwerte voneinander zu vermuten war.

Für die Beziehung zwischen den Probanden des Normalkollektivs konnte eine gleichlautende Annahme nicht getroffen werden, da:

$[\chi^2_R(LTB_4) = 25{,}6,\ \chi^2_R(LTC_4) = 22{,}6,\ \chi^2_R(LTB_4/LTC_4 = 17{,}7;$
Prüfgröße $\hat{\chi}^2_R = 17{,}7$ für $K = 3$, $n = 10$ und $p = 0{,}01]$.

Folglich wurde mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirmoff-Tests für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben überprüft, ob die beiden Untergruppen der weiblichen und männlichen Versuchsteilnehmer hinsichtlich der täglichen Ausscheidung an Leukotrienen dennoch einer Grundgesamtheit angehörten. Als schärfster Homogenitätstest erfaßt das genannte Verfahren Unterschiede des Mittelwerts und Medians, der Streuung, der Schiefe und Unterschiede der Verteilungsfunktion.

Bei zweiseitiger Fragestellung überschritt die größte zu beobachtende Ordinatendifferenz D zwischen den beiden Summenkurven die kritische Differenz nicht.

$$\hat{D} = 9/15 \text{ für } n = 15 \text{ und } P = 0{,}01$$

$$(D_{LTB_4} = \frac{4}{15} \; , \; D_{TLC_4} = \frac{2}{15} \; , \; D_{LTB_4/LTC_4} = \frac{2}{15} \;).$$

Somit waren zwar männliche und weibliche Versuchsteilnehmer des Normalprobandenkollektivs als eine Grundgesamtheit anzusehen, zumal sich die Mittelwerte der täglichen Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 beider Gruppen kaum voneinander unterschieden, doch wies der Friedman-Test darauf hin, daß sowohl bei Frauen als auch bei Männern die Streuung zwischen den Individien beträchtlich war. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Personen wurden vor allem in der Tagesausscheidung von Leukotrien B_4 Abb. 36) deutlich. Die Resultate der Bestimmung von Leukotrien C_4 oder das Verhältnis aus beiden Werten enthielt keine derartige Information.

4.1.3. Beziehung der täglichen Ausscheidung an Leukotrienen zu anderen Faktoren

Durch graphische Gegenüberstellung und Rechnung ließ sich zeigen, daß es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Ausscheidung von Leukotrien B_4 und C_4 gab. Hohe Meßwerte an LTB_4 waren weiterhin nicht mit einer Zunahme an LTC_4 im Urin verknüpft.

Ebenso war keine Korrelation zwischen der Urinausscheidung an Leukotrienen und dem Alter oder dem Volumen des 24-Stundenurins zu verzeichnen. Die Gruppe der Normalprobanden war auch unter diesen Gesichtspunkten homogen zusammengesetzt.

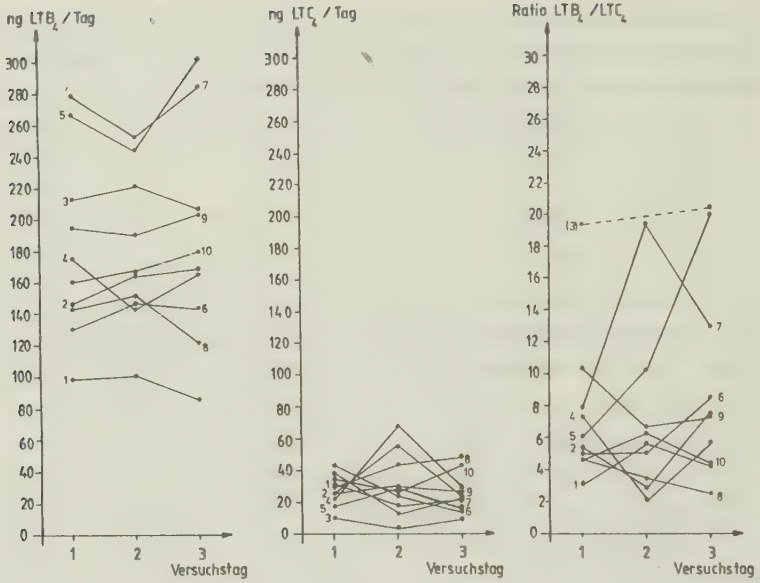


Abb. 36: Verteilung der Tageswerte von LTB_4, LTC_4 und LTB_4/LTC_4 der Normalprobanden.

Demgegenüber fiel auf, daß Männer und Frauen im Durchschnitt etwa 7 mal höhere Mengen an Leukotrien B_4 ausschieden als an Leukotrien C_4. Dieser Befund war insofern erstaunlich, als angenommen werden sollte, daß ausgehend von der gemeinsamen Vorstufe des instabilen Endoperoxids Leukotrien A_4 zu gleichen Teilen eine weitere Umwandlung in Dihydroxy-Fettsäuren, z.B. Leukotrien B_4, und in peptidhaltige Leukotriene, z.B. Leukotrien C_4, stattfinden sollte. Auf die eindeutige Verschiebung der Meßwerte zugunsten von LTB_4 wird später noch Bezug genommen.

4.2. Akutphase nach Nierentransplantation

Analog zu der Auswertung der Kontrollgruppe und der nachfolgenden Gruppe der Patienten in der chronischen Phase nach Nierentransplantation wurden die Daten der 12 Patienten in der Akutphase nach Nierentransplantation zusammengestellt. Während es sich bei den beiden anderen Kollektiven um Einzelbefunde und Stichproben handelt, die nach entsprechender statistischer Bewertung als Grundgesamtheiten gelten können, stand hier der longitudinale Verlauf der postoperativ vorliegenden Aufzeichnungen (stationäre Aufenthalte und ambulante Untersuchungen) im Vordergrund.

Aus den Daten der Krankenblätter wurde für jeden Patienten ein charakteristisches klinisches Profil erstellt, das die wichtigsten Angaben aus der Anamnese, über die Transplantatübereinstimmung und die Herkunft des Organs, über die peri- und postoperative Behandlung, über die stationäre und ambulante Betreuung sowie über Abstoßungsreaktionen und begleitende Erkrankungen einschließlich der entsprechenden Diagnostik enthielt.

Zu diesem Zweck wurden die für das Transplantationsgeschehen relevanten Daten für jeden Patienten in einer Übersicht zusammengefaßt und einer Zeitachse zugeordnet (diagnostische Maßnahmen, Medikamente, Blutwerte und Nierenfunktion, Urinaussscheidung, Meßwerte der Leukotrienbestimmungen im Urin). Die Aufzeichnungen der Krankenblätter waren an jeweils speziell gekennzeichneten Stellen nicht vollständig dokumentiert bzw. einzelne Parameter waren nicht erhoben worden. Die Bestimmung der Leukotriene erfolgte nur während des stationären Aufenthalts, der sich unmittelbar an die Nierentransplantation anschloß. Damit konnte nur ein kurzer Abschnitt des postoperativen Verlaufs durch die Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 verfolgt werden. Dieser

Tab. 9: Therapieschema für die Behandlung mit Azathioprin und Ciclosporin A.

(1) Azathioprin (Imurek^{R})

Zeit	Azathioprin	ATG	Prednisolon
OP während OP	4 mg/kg KG i.v.		250 mg i.v.
6 Std. post OP			250 mg i.v.
1. Tag	2-3mg/kg KG p.o. (nach Leukozyten).	3mg/kg KG i.v. (14 Tage)	30 mg p.o.
21. Tag			25 mg p.o.
28. Tag			20 mg p.o.
ab 3. Monat			15 mg p.o.
ab 6. Monat			10 mg p.o.
ab 9. Monat			7,5 mg p.o.
ab 12. Monat			5 mg p.o.

(2) Ciclosporin A (Sandimmun^{R})

Zeit	Ciclosporin A		Prednisolon
OP während OP	3 mg/kg KG Dauerinfusion (Dosisanpassung nach Spiegel)		250 mg i.v.
6 Std. post OP			250 mg i.v.
1. Tag			100 mg i.v.
2. Tag			75 mg i.v.
3. Tag			50 mg i.v.
4. Tag			40 mg p.o.
5. Tag			40 mg p.o.
6. Tag			40 mg p.o.
ab 7. Tag	10 mg/kg KG Trinklösung (Dosisanpassung nach Spiegel)		
7.-14. Tag			30 mg p.o.
15.-29. Tag			20 mg p.o.
30.-61. Tag			15 mg p.o.
ab 3. Monat			10 mg p.o.
ab 6. Monat			7,5 mg p.o.
ab 12. Monat			5 mg p.o.

Nachteil wurde teilweise dadurch ausgeglichen, daß aus der Gruppe der Patienten in der chronischen Phase nach Nierentransplantation Referenzwerte für den anschließenden Zeitraum vorlagen.

Die klinischen Befunde und Änderungen in der Therapie wurden stichwortartig beschrieben und diskutiert, ebenso die diagnostischen Maßnahmen. Die beiden Behandlungsschemata, die auf Azathioprin bzw. auf Ciclosporin A zur Abwendung von Transplantat-Abstoßungsreaktionen basierten, erfolgten anhand der aus der Vorgeschichte bekannten Risikofaktoren. Zur symptomatischen und begleitenden Therapie gehörten noch Antibiotika, Antimykotika, Hyperimmunglobuline, Anti-Thymozyten-Globuline (ATG), Thrombozytenaggregationshemmstoffe, Antacida, H_2-Rezeptorenblocker, Antihypertensiva und Diuretika.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Patientendaten bietet Tab. 10. Hier sind neben dem Therapieschema die kennzeichnenden Werte für die Transplantatfunktion, die Anzahl und Art der Abstoßungsreaktionen und Angaben zur Leukotrienausscheidung im Urin aufgeführt.

Tab. 10: Übersicht über die wichtigsten Daten der Patienten in der Akutphase nach Nierentransplantation.

Patient Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dialyse (Jahre)	Diagnose	Therapie Aza.	Therapie Cic.	Stationär (Tage)	Abstoßung	Kreatinin mg/dl prä. operativ	Kreatinin mg/dl post. operativ	HLA-Identitäten	$\bar{x}$ LTB_4 (ng/Tag)	$\bar{x}$ LTC_4 (ng/Tag)	LTB_4/LTC_4
1	♀	32	4 1/2	chron. Pyelon. Reflux IIIa	x	ab 10/84	46	2	7,9	1,5	4	99±44	83±29	1,20±0,35
2	♀	16	2 1/2	chron. Pyelon. V.a. Alp.-S.		x	33	-	7,7	2,0	4	76±20	59±16	1,35±0,39
3	♀	48	4 1/2	inter-stit. Nephrit.		x	23	-	7,6	2,2	4	78±44	43±22	2,50±1,50
4	♂	41	3 1/2	chron.GN	x		37	1	12,0	1,5	5	55±15	38±12	1,60±0,61
5	♂	48	9	chron.GN	x	x*	78	7	15,3	2,8	1	77±52	80±27	1,02±0,66
6	♂	48	1/2	Cysten-nieren	x	x*	103	3	9,1	1,6	4	98±36	104±26	0,89±0,24
7	♂	49	8	chron.PN	x		45	1	9,0	1,7	4	109±35	64±18	1,88±0,66
8	♂	47	1 1/2	chron.GN	x		19	1	13,5	1,2	3	107±55	43±15	2,40±0,55
9	♂	22	1 1/2	chron.PN	x		31	-	10,1	1,1	2	76±28	60±29	1,29±0,25
10	♂	49	2	chron.GN		x	22	-	11,3	2,6	4	62±29	49±30	1,57±0,93
11	♂	57	8 1/2	chron.GN		x	20	-	10,8	1,3	4	95±61	45±26	1,67±0,82
12	♂	54	4 1/2	chron.PN Z.n.TX	x	x*	56	5	13,6	1,8	4	75±34	96±41	0,85±0,49

x* = später Dreifachtherapie

4.2.1. Patientin 1, 32 Jahre

Bei der Patientin bestand seit 4 Jahren eine dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz auf dem Boden einer chronischen Pyelonephritis. Ursache dafür war ein beidseitiger Reflux 3. Grades. Als weitere Erkrankung im Bereich der Nieren wurde eine Nephroptose operativ behandelt. Das Spenderorgan stammte von einer 17-jährigen Frau, die ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatte. Zwischen Spenderorgan und der Empfängerin bestand folgende Übereinstimmung:

Spender:	A 3	Aw 31	Bw 6	B 7		B 18		Cw 7	DRw 3	DRw 4
Empfänger:	A 3		Bw 6		B 14	B 18	Cw 2		DRw 3	DRw 4

Spender:	
Empfänger:	DRw 8

Die Immunsuppression wurde primär mit Steroiden, Azathioprin und Anti-Thymozyten-Globulin durchgeführt. Präoperativ lag das Serumkreatinin bei 7,9 mg/dl. Sofort nach Freigabe der Anastomosen zeigte die Niere eine gute Funktion. Das Kreatinin fiel bis zur Entlassung kontinuierlich auf Werte um 2,0 mg/dl ab. Die Serumharnstoffwerte stiegen dagegen bis zum 7. postoperativen Tag an (Maximum 88 mg/dl) und lagen am Entlassungstag mit 50 mg/dl etwas oberhalb des präoperativen Wertes. Die endogene Kreatinin-Clearence betrug meist 20 ml/min., nur abschließend wurden doppelt so hohe Werte gemessen. Nuklearmedizinisch gesehen war das Transplantat gut durchblutet. Die tägliche Urinausscheidung nahm von anfangs 2 Liter auf maximal 4 Liter zu. Zeitweise wurden Keime im Urin nachgewiesen und testgerecht behandelt. Die Ausscheidung von LTB_4 im Urin stieg von 48 ng am 3. postoperativen Tag auf über 180 ng/Tag am 9. postoperativen Tag und pendelte sich bis zur Entlassung auf einen Wert zwischen 80 und 140 ng/Tag ein. In den ersten Tagen nach der Transplantation wurden gleiche Mengen an LTC_4 und LTB_4 gemessen, am 7. und 8. postoperativen Tag stieg die Ausscheidung von LTC_4 jedoch sprunghaft an und lag um ein Drit-

tel über der von LTB_4. Alle folgenden Meßwerte bis zur Entlassung zeigten aber, daß die Produktion an Leukotrien B_4 überwog (LTB_4/LTC_4 zwischen 1,2 und 1,7).

In zeitlicher Abfolge wie die Verschiebung im Verhältnis zwischen den beiden Lipoxygenaseprodukten entwickelten sich die oben geschilderten Werte für den Kreatinin-, deutlicher aber noch den Harnstoffgehalt des Serums. Sobald mehr Leukotrien B_4 und C_4 ausgeschieden wurde (ab 9. postoperativen Tag), fielen die Retentionswerte kontinuierlich ab.

Ein Zusammenhang zwischen Leukotrienen und Leukozyten war während des ersten stationären Aufenthalts nicht zu erkennen, es wurden durchschnittlich 7000 Zellen/mm^3 gezählt. Mit der Verbesserung der Nierenfunktion ging ein Anstieg der Thrombozyten um 200 000/mm^3 einher. Diese durch die Steroidmedikation bedingte Zunahme der Thrombozyten verschwand mit einer Latenz von einer Woche, erforderte aber wegen der erhöhten Gefahr einer Mikrothrombosierung mit Verschluß von kleinen Endarterien die langfristige Anwendung eines Thrombozytenaggregationshemmstoffes (Dipyridamol).

Einen nachhaltigeren Effekt hatte die sich im postoperativen Verlauf langsam abzeichnende Anämie mit einem Hämoglobingehalt von zuletzt 4,6 g/dl. Hinzu kam als Folge der Immunsuppression mit Azathioprin eine Leukopenie von 2100 Zellen/mm^3, die die erneute stationäre Aufnahme erforderlich machte. Eine gastrointestinale Blutung als Ursache der Anämie konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Binnen weniger Tage stieg das Serumkreatinin von 1,6 mg/dl auf 7,3 mg/dl und der Gesamtstickstoffgehalt von 29 auf 200 mg/dl. Hinzu kamen schließlich ein Rückgang in der Urinausscheidung und ein Harnwegsinfekt. Durch Punktion des

Transplantats ließ sich die Diagnose einer chronischen interstitiellen lymphoplasmazellulären Abstoßungsreaktion sichern. Möglicherweise waren kurzfristig angestiegene Leukozytenwerte während der ambulanten Kontrollen in den vorausgegangenen Tagen als erste Anzeichen der Abstoßungsreaktion zu werten.

Nach insgesamt 7 x 250 mg Prednisolon/Tag, der Gabe von leukozyten- und thrombozytenarmen Erythrozyten-Konzentraten und nach Ersatz von Azathioprin durch Ciclosporin A verbesserte sich die Nierenfunktion allmählich wieder (Kreatinin 4,9 mg/dl, Harnstoff 98 mg/dl, Hb 10,8 g/dl).

Die letzten vorliegenden Meßwerte ca. 2 1/2 Monate nach Transplantation zeichnen insgesamt ein günstiges Bild: Hb 14,3 g/dl, Leukozyten 8600/mm^3, Harnstoff 25 mg/dl, endogene Kreatinin-Clearence 40 ml/min. .

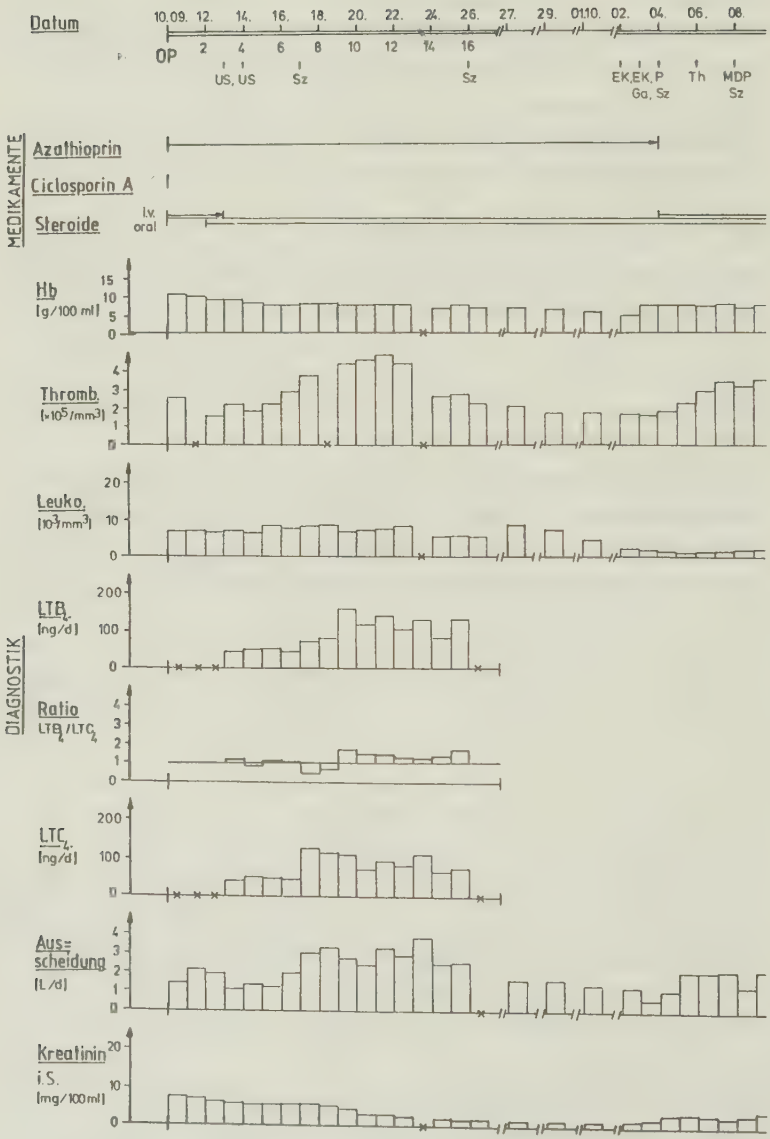
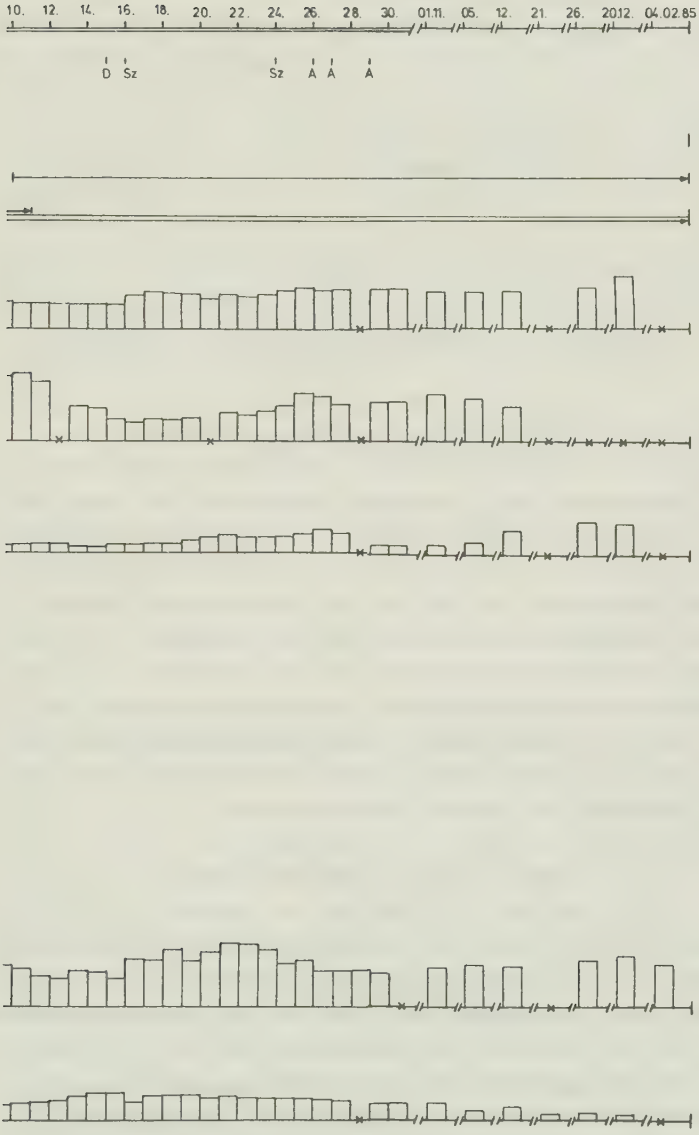


Abb. 37: Patientin 1, 32 Jahre.


10. 12. 14. 16. 18. 20. 22. 24. 26. 28. 30. 01.11. 05. 12. 21. 26. 20.12. 04.02.85
D Sz
Sz A A A

4.2.2. Patientin 2, 16 Jahre

Ursache für die seit 2 Jahren bestehende dialysepflichtige Niereninsuffizienz war eine chronische Pyelonephritis, wobei wegen einer Nervus opticus-Atrophie beidseits mit inkompletter Amaurose der Verdacht auf ein Alport-Syndrom (autosomal dominant erbliche interstitielle Nephritis, Innenohrentzündung, Retinitis) geäußert wurde. Vor der Transplantation war die Patientin mehr als 5 mal transfundiert worden. Das Transplantat stammte von einem 55 Jahre alten Mann, der ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatte. Die HLA-Typisierung brachte folgende Übereinstimmung:

Spender:	A 2	Bw 4	Bw 51		DRw 3		DRw 6
Empfänger:	A 2	Bw 4	Bw 51	Bw 57		DRw 5	

Die immunsuppressive Therapie bestand aus Steroiden und Ciclosporin A. Zunächst war der postoperative Verlauf komplikationslos. Die Niere nahm sofort ihre Funktion auf, so daß nicht mehr dialysiert werden mußte. Das Kreatinin sank innerhalb von fünf Tagen von 7,7 mg/dl auf 1,5 mg/dl ab, die Urinausscheidung lag bei ca. 2 Liter/Tag. Am 6. postoperativen Tag stieg das Serumkreatinin jedoch auf 2,1 mg/dl. Parallel dazu wuchsen die Harnstoffwerte auf über 60 mg/dl am 5. und 6. postoperativen Tag. Die Urinausscheidung ging auf 1 Liter/Tag zurück.

Eine erneute Verschlechterung der Retentionswerte zeigte sich gegen Ende der 2. Woche des stationären Aufenthalts. Bei gleichbleibendem Harnstoffgehalt des Serums stieg das Kreatinin am 14. Tag auf 2,0 mg/dl. Gleichzeitig traten subfebrile Temperaturen und eine leichte Blutdruckerhöhung auf. Deshalb wurde am 13. postoperativen Tag eine Nierenbiopsie durchgeführt, die eine fast komplette Kurvellationsnekrose des Nierenparenchyms mit leukozytärer Reaktion ergab. Thrombotisches Material wurde jedoch nicht gefunden.

Das Nierenszintigramm wies auf einen Polinfarkt hin, welcher bei der Punktion offensichtlich direkt getroffen wurde. Diesem Geschehen ging ein massiver Anstieg der Thrombozyten von ca. 120 000 Zellen/mm^3 auf weit über 400 000 Zellen/mm^3 voraus. Offensichtlich überwog die steroid-induzierte Thrombozytenausschüttung den Effekt des Aggregationshemmstoffes auf die zelluläre Gerinnung.

Das Infarktgeschehen an der Niere spiegelte sich auch an der Zahl der Leukozyten im peripheren Blutbild wider. Einem anfänglichen Anstieg auf 15 000 Zellen/mm^3 folgte eine Leukozytose von 26 700 Zellen/mm^3, die sich jedoch innerhalb von drei Tagen spontan zurückbildete.

Die Ausscheidung an LTB_4 im Urin lag großteils zwischen 50 und 100 ng/Tag und zeigte während des Untersuchungszeitraums keine nennenswerten Veränderungen. Analog dazu bewegten sich die Meßwerte für LTC_4 im wesentlichen zwischen 30 und 80 ng/Tag. Infolgedessen war das Verhältnis der Ausscheidung beider Metabolite im Urin während der 1. Woche eindeutig zugunsten von LTB_4 verschoben. Solange jedoch die Funktionsminderung der transplantierten Niere im Gefolge des lokalen Infarktgeschehens bestand, überwog demgegenüber die Exkretion von LTC_4 (Ratio <1). Wie beim vorhergehenden Patienten war anschließend ein Absinken des Serumkreatinins als Ausdruck der Verbesserung der Nierenleistung mit einer Mehrausscheidung an LTB_4 verbunden.

Der Rückgang des Befundes an der Niere und im Blutbild erfolgte ohne spezielle Therapie, so daß die Retentionswerte bei Entlassung (Kreatinin 1,6 mg/dl, Harnstoff 32 mg/dl) zufriedenstellend waren. Die glomeruläre Filtrationsrate lag bei 50 ml/min., die tägliche Urinausscheidung betrug im Mittel mehr als 2 Liter. Es bestand schließlich noch eine geringgradige Leukozytose von 12 900 Zellen/mm^3 und eine Anämie, die sich nach Gabe von 2 Erythrozytenkonzen-

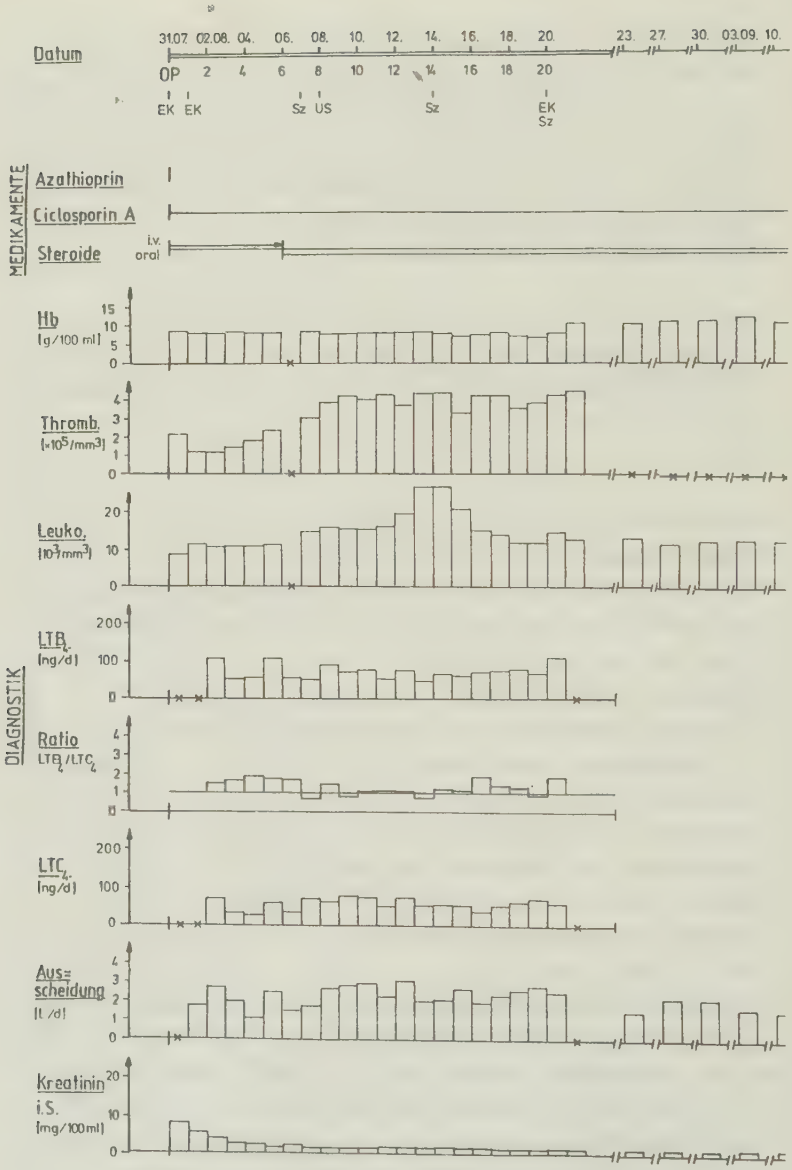
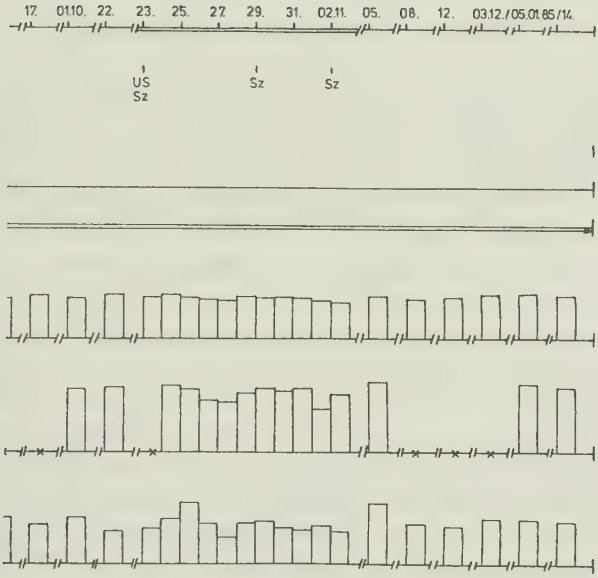


Abb. 38: Patientin 2, 32 Jahre.


17. 01.10. 22. 23. 25. 27. 29. 31. 02.11. 05. 08. 12. 03.12./05.01.85/14.
US
Sz
Sz
Sz

traten etwas besserte.

Zwei Monate später mußte die Patientin jedoch wegen einer Verschlechterung der Retentionswerte (Kreatinin 3,7 mg/dl, Harnstoff 68 mg/dl), einer Abnahme der Diurese (<1 Liter/ Tag) und wegen des sonographisch geäußerten Verdachts auf eine Transplantatabstoßung erneut stationär aufgenommen werden. Die übrigen laborchemischen Parameter ergaben keine Besonderheiten.

Es wurde sofort mit einer entsprechenden steroidalen Behandlung über insgesamt 4 Tage begonnen. Bei der erneuten Punktion des Transplantats im Anschluß an diese Therapie fand sich jedoch kein Anhalt für eine akute zelluläre Abstoßungsreaktion. Vielmehr mußte die Erhöhung der Retentionswerte auf ein akutes Nierenversagen zurückgeführt werden, dessen Ursache möglicherweise auf der Nephrotoxizität von Ciclosporin A beruhte. Dafür sprach auch ein weiterer Anstieg des Harnstoffs auf 96 mg/dl und der zunächst fehlende Rückgang des Serumkreatinins unter der Abstoßungsbehandlung. Zurück blieb ein Residualzustand mit spürbar eingeschränkter Nierenfunktion, der sich auch während der weiteren ambulanten Betreuung nicht wesentlich besserte.

4.2.3. Patientin 3, 48 Jahre

Die Patientin war seit 4 Jahren wegen einer terminalen Niereninsuffizienz auf dem Boden einer interstitiellen Nephritis dialysepflichtig. Weiter waren eine renale Hypertonie, eine renale Anämie und eine Infektion mit Herpes simplex-Virus bekannt.

Die Patientin war mit 3 Transfusionen vorbehandelt worden. Sie erhielt die Niere eines 7-jährigen Jungen, der an den Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas bei einem Verkehrsunfall starb. Das Ergebnis der HLA-Typisierung lautete:

Spender:		A 9		Aw 24(9)	B 7		Bw 35		Cw 4	
Empfänger:	A 1		A 11	Aw24(9)		B 27	Bw 35	Cw 1	Cw 4	
Spender:	Cw 7	DRw 2	DRw 5							
Empfänger:			DRw 5							

Die Immunsuppression wurde mit Ciclosporin A und Steroiden eingeleitet. Die transplantierte Kinderniere zeigte initial trotz guter Durchblutung eine mangelhalte Funktion mit eier Diurese von lediglich ca. 500 ml pro Tag. Offenbar bestand primär ein akutes Nierenversagen. Das Kreatinin stieg deshalb von 7,6 mg/dl bis auf 14,1 mg/dl am 6. postoperativen Tag. Auf eine Dialyse wurde trotzdem verzichtet.

Eine nennenswerte Ausscheidung unter der Therapie mit Furosemid kam erst am 8. postoperativen Tag zustande. In der Folgezeit sank das Kreatinin bis zur Entlassung kontinuierlich auf schließlich 2,5 mg/dl ab, während der Serumharnstoff nach maximalen Werten von 142 mg/dl (9. postoperativer Tag) mit 72 mg/dl noch erhöht war.

Fraglich war die Ursache des initialen akuten Nierenversagens. Ein Zusammenhang mit Ciclosporin A lag nahe, da

der nephrotoxische Effekt dieses Medikaments bekannt ist, der u.a. zu einem irreversiblen und dosisabhängigen Anstieg von Harnstoff und Kreatinin im Serum führen kann. Es fiel zwar eine Leukozytose von schließlich mehr als 16 000 Zellen/mm^3 auf, doch lieferten weder Ultraschall noch Szintigraphie einen Anhalt für eine Abstoßungsreaktion.

Nach Umstellung der parenteralen Ciclosporin A-Therapie auf eine orale Medikation und der Gabe von 2 Blutkonserven verbesserten sich ohne weitere adjuvante Maßnahmen die Urinausscheidung und die Retentionswerte als Zeichen dafür, daß die Niere nach einer Latenzphase ihre Funktion wieder aufgenommen und sich dann stabilisiert hatte.

Sowohl anhand der Einzelwerte als auch des Quotienten aus LTB_4 und LTC_4 war die überwiegende Ausscheidung des zellulär aktiven Dihydroxy-Leukotriens erkennbar. Darunter befanden sich auch Meßwerte, wo die Unterschiede zwischen der Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 größer waren als bei anderen Patienten (am 9. postoperativen Tag LTB_4/LTC_4 > 20). Nachmessungen bestätigten diese Ergebnisse. Zwar bestand ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der erhöhten Freisetzung an LTB_4 und dem Anstieg der Leukozytenzahlen, doch sanken die Zellzahlen erst nach verminderter Leukotrienproduktion ab. Dennoch war festzustellen, daß der Quotient aus LTB_4 zu LTC_4 von 2,50 offenbar ein prognostisch günstiges Zeichen darstellte. Während des stationären Aufenthalts kam es nämlich zu keiner Situation, in der zur Sicherung der Nierenfunktion Steroide gegeben werden mußten. Zum anderen zeigte die Entwicklung des weiteren ambulanten Verlaufs, daß auch später keine derartigen therapeutischen Interventionen notwendig waren. Die renale Anämie besserte sich zusehends, Kreatinin, Harnstoff und glomeruläre Filtrationsrate erreichten ideale Werte. Zwischenzeitlich bestand lediglich eine grenzwertige Leuko-

zytose, die sich durch Erhöhung der Ciclosporin A-Dosis korrigieren ließ. Zusammenfassend ergab sich ein völlig komplikationsloser postoperativer Verlauf.

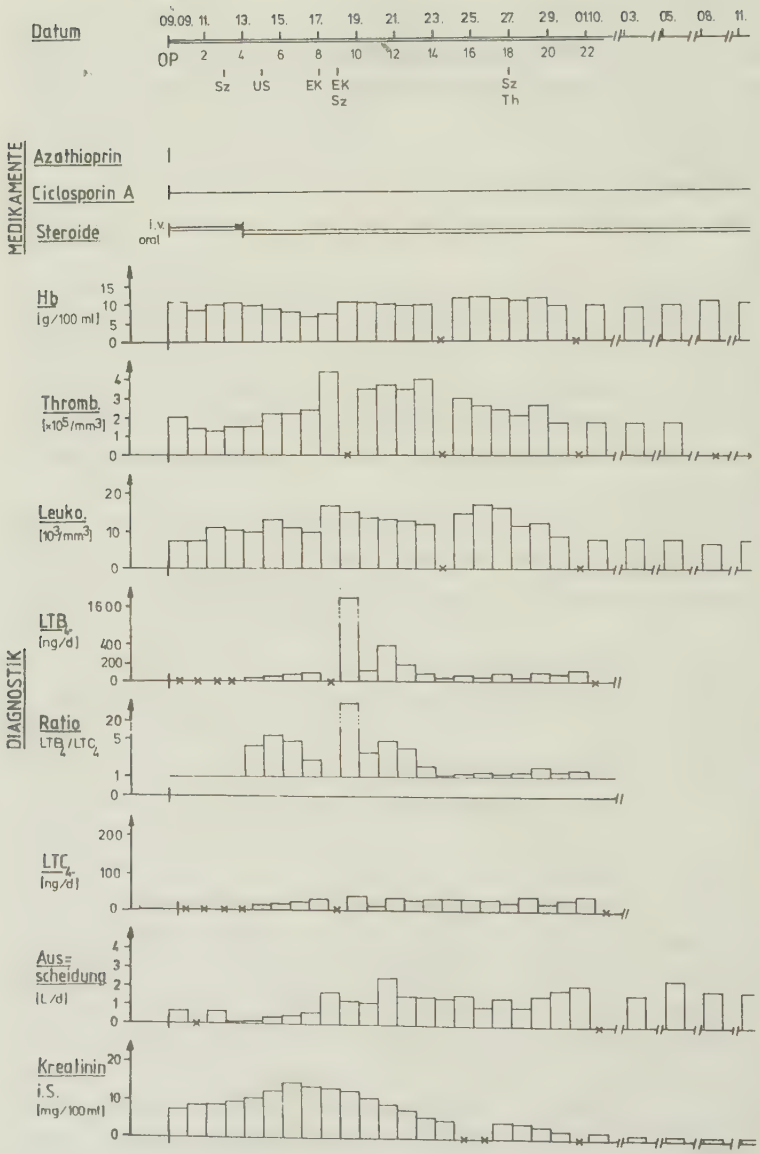
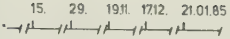
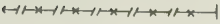


Abb.39: Patientin 3, 48 Jahre.


15.
29.
19.11.
17.12.
21.01.85



4.2.4. Patient 4, 41 Jahre

Seit 3 Jahren war der Patient wegen einer chronischen Glomerulonephritis in Verbindung mit einer renalen Osteopathie dialysepflichtig. Das Spenderorgan stammte von einer 51-jährigen Patientin, die an den Folgen einer intracerebralen Massenblutung starb. Die Typisierung für Spender und Empfänger lautete:

Spender:	A 2	A 11			B 35	B 37	Bw 4	Bw 6	
Empfänger:		A 11	Aw 24	B 27	B 35		Bw 4	Bw 6	Cw 2	Cw 4

Spender:	Cw 6	DRw 4	DRw 6
Empfänger:			DRw 6

Die immunsuppressive Therapie bestand anfangs aus Azathioprin, Steroiden und Anti-Thymozyten-Globulin (ATG). Postoperativ kam es zu einer guten Urinausscheidung mit einer Diurese von mehr als 2 Litern pro Tag, so daß der Patient in der Folgezeit nicht mehr dialysiert werden mußte. Allerdings sank das Serumkreatinin (Ausgangswert um 12 mg/dl) nicht ab, die Konzentration des Harnstoffs im Serum stieg sogar an (von 60 mg/dl auf über 180 mg/dl).

Durch Ultraschall-Untersuchung wurde schließlich eine Blutung in der Transplantatloge diagnostiziert, die auch durch Gabe von Frischplasma nicht zu unterdrücken war, so daß eine operative Revision notwendig wurde. Im Anschluß daran besserte sich die Funktion des Transplantats eindeutig. Das Kreatinin fiel kontinuierlich auf 3,0 mg/dl und der Harnstoffgehalt auf 60 mg/dl ab. Parallel dazu besserte sich die glomeruläre Filtrationsrate auf Werte von 30 ml/min. .

Diese günstige Entwicklung wurde durch eie geringgradige interstitielle Abstoßungsreaktion mit begleitendem Nierenversagen am 20. postoperativen Tag unterbrochen, die sich durch subfebrile Temperaturen, einen Anstieg der Retentionswerte in Verbindung mit einem Abfall der Clearence-

Funktion und der Urinelektrolyte sowie einer mäßigen Leukocytose äußerte. Nach hochdosierter Behandlung mit Steroiden besserte sich der Zustand geringfügig, so daß der Patient vorübergehend entlassen werden konnte.

Da die Retentionswerte während ambulanter Kontrollen keine abnehmende Tendenz zeigten, wurde der Patient erneut stationär aufgenommen. Eine Punktion des Transplantats ergab histologisch die Diagnose einer mittelschweren interstitiellen Abstoßungsreaktion, die erneut mit Steroiden und Antithymozytenglobulin behandelt wurde. Unter dieser Therapie sanken die Retentionswerte auf 1,5 mg/dl (Kreatinin) und 24 mg/dl (Harnstoff) ab. Während der weiteren ambulanten Kontrollen blieben die entsprechenden Parameter auf diesem Niveau, die Kreatinin-Clearance verbesserte sich auf 60 - 70 ml/min. .

Für eine Stabilisierung der Transplantatfunktion sprach auch die Konsolidierung des roten Blutbildes. Während der beiden ersten stationären Aufenthalte fielen das Hämatokrit von 42 g% auf 20 g% und das Hämoglobin von 12,9 g/dl auf 6,0 g/dl. Im Anschluß an die 2. Abstoßungsbehandlung stiegen die Werte bis zum vorliegenden Endpunkt der ambulanten Untersuchungen auf 47 g% Hämatokrit und auf 15,4 g/dl Hämoglobin an, so daß wieder eine entsprechende renale Stimulierung des Knochenmarks angenommen werden konnte. Die Thrombozytose mit maximal 560 000 Zellen/mm^3 am 15. postoperativen Tag war auf die Wirkung der hochdosierten Steroidbehandlung zurückzuführen und ging spontan auf Normalwerte zurück.

Die Ausscheidung an Leukotrienen im Urin lag zwischen 40 - 70 ng LTB_4/Tag und 20 - 60 ng/Tag mit einer Ratio, die eindeutig zugunsten von LTB_4 verschoben war. Zum Zeitpunkt der klinisch und histologisch nachweisbaren Abstoßungsreaktion am 20. postoperativen Tag kehrte sich das Verhält-

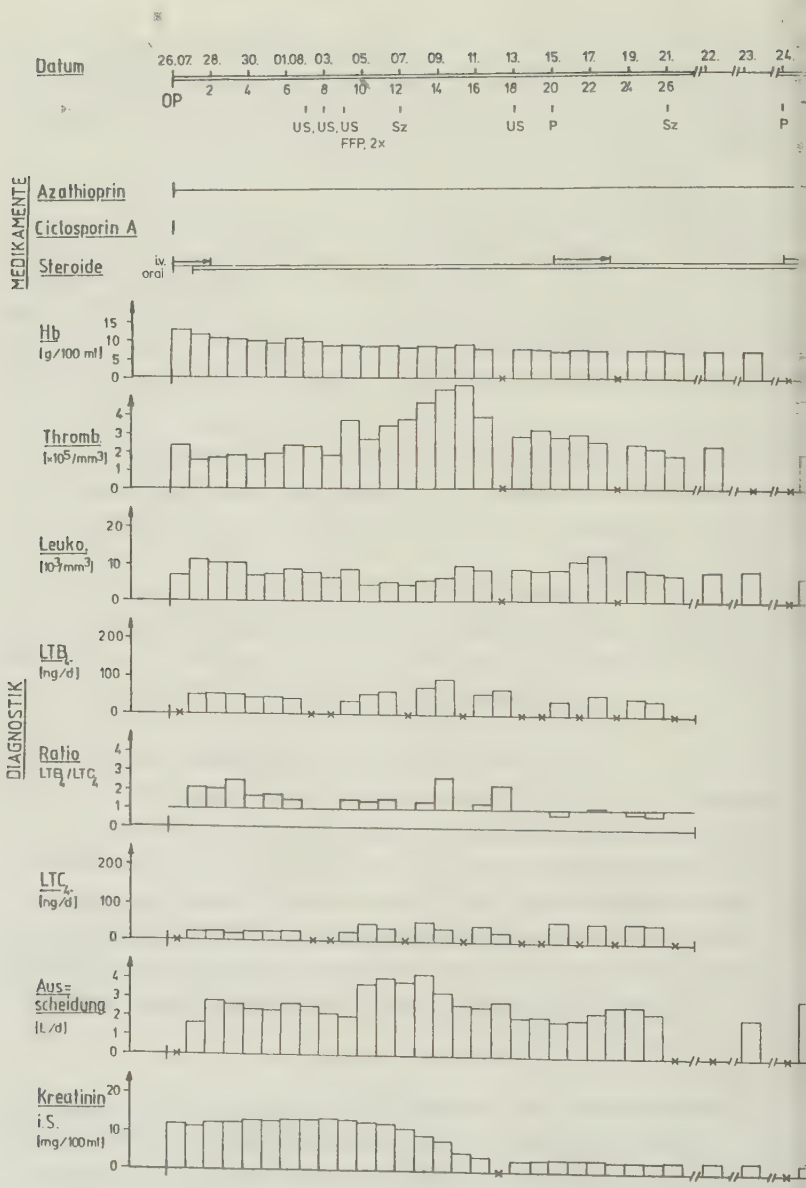
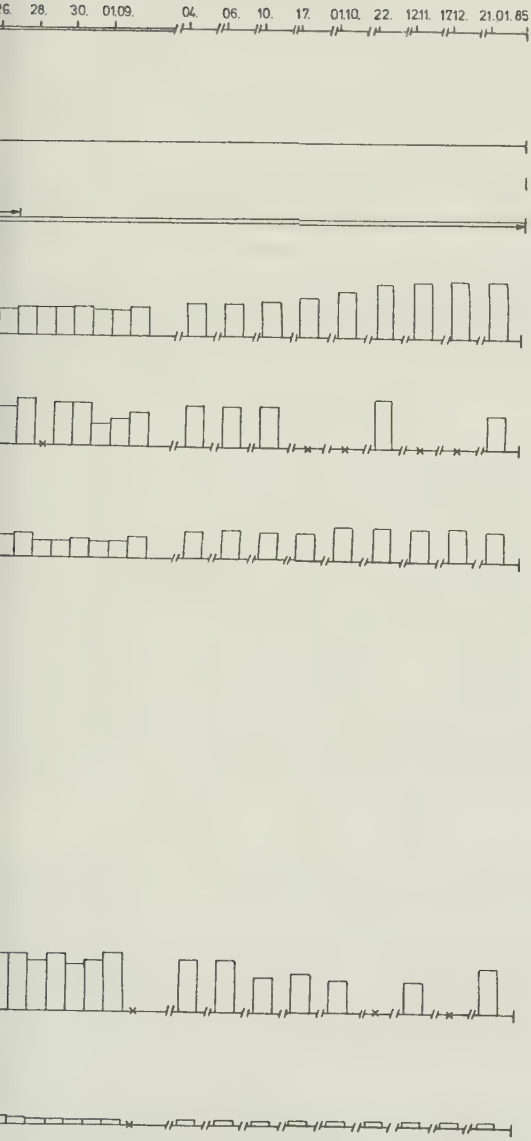


Abb. 40: Patient 4, 41 Jahre.


26. 28. 30. 01.09. 04. 06. 10. 17. 01.10. 22. 12.11. 17.12. 21.01.85

nis beider Substanzen um. Leider lagen für die Folgezeit keine Meßwerte mehr vor, um den weiteren Verlauf des Quotienten zu beurteilen. Ein Zusammenhang mit dem Abstoßunsgeschehen liegt jedoch nahe, zumal andere Laborparameter wie oben beschrieben entsprechende Veränderungen zeigten.

Insgesamt gesehen war der Verlauf nach Transplantation als günstig zu beurteilen. Die Organfunktion stabilisierte sich im Stadium der kompensierten Retention nach 2-maliger Intervention mit Steroiden. Sämtliche Laborwerte befanden sich im Normbereich, komplizierende Zusatzerkrankungen traten nicht auf.

4.2.5. Patient 5, 48 Jahre

Bei dem Patienten bestand seit 9 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz auf dem Boden einer chronischen Glomerulonephritis in Verbindung mit einem renalen Hyperparathyreoidismus und einer fortgeschrittenen Osteomalazie. Das Spenderorgan stammte von einem 63-jährigen Patienten mit einer Kopfverletzung. Zwischen Spender und Empfänger bestand folgende Übereinstimmung:

Spender:		A 3		A 19		B 5	B 14			DRw 6
Empfänger:	A 2		A 11		Bw 4			Bw 44	B 51	DRw 6
Spender:	DRw 7									
Empfänger:										

Wegen der ossären Vorschädigung, dem Alter des Organspenders und der nicht idealen Übereinstimmung in der HLA-Typisierung wurde eine Therapie mit Ciclosporin A und Steroiden eingeleitet. Zunächst zeigte das Transplantat eine gute Funktion, das Serumkreatinin fiel innerhalb einer Woche von 15,3 mg/dl auf 8,8 mg/dl. Am 7. postoperativen Tag traten jedoch die klinischen und laborchemischen Zeichen einer Transplantatabstoßung auf und es wurde mit 3 x 250 mg Prednisolon behandelt. Am 21. postoperativen und am 29. postoperativen Tag bestand erneut der begründete Verdacht einer Abstoßungsreaktion und es erfolgte wiederum eine steroidale Therapie.

Mit Hilfe dieser Maßnahmen gelang es, die Nierenfunktion schrittweise zu verbessern, so daß am Ende des ersten Behandlungszeitraumes das Kreatinin bei 2,6 mg/dl, der Harnstoff bei 38 mg/dl und die glomeruläre Filtrationsrate bei ca. 30 ml/min. lagen. Eine Leukozytose von 20 000 Zellen/mm^3 als höchster Wert am 23. postoperativen Tag zeigte jedoch an, daß eine deutliche immunologische Antwort des Empfängerorganismus auf das Transplantat vorlag, die durch die gehäufte Gabe von hochdosierten Steroiden nur kurzfristig zu unterdrücken war. Dementsprechend bestand seitens des roten Blutbildes ständig die Tendenz zur Polyglobulie; eine Throm-

bocytose entwickelt sich nur nach der 1. Abstoßungsbehandlung.

Am 35. postoperativen Tage konnte der Patient zunächst entlassen werden, am 40. postoperativen Tag war wegen einer bioptisch gesicherten mittelschweren chronischen interstitiellen Abstoßungsreaktion erneut die stationäre Aufnahme und die hochdosierte Behandlung mit Steroiden notwendig. Die histologischen Veränderungen wurden als irreversibel beurteilt. Zwar zeigte sich auch dieses Mal ein gutes Ansprechen der transplantierten Niere auf Prednisolon (Rückgang des Kreatinins von 3,2 auf 2,3 mg/dl), die supportive Therapie mit Anti-Thymozyten-Globulin wurde jedoch nicht vertragen und mußte abgebrochen werden, so daß die oben erwähnte zelluläre Immunantwort nur unzureichend behandelt werden konnte. Infolgedessen kam es am 50. postoperativen Tag erneut zu einer Abstoßungsreaktion (Anstieg von Kreatinin und Harnstoff). Zwar gelang auf übliche Weise wiederum eine Besserung der Nierenfunktion (Kreatininabfall von 3,4 auf 2,3 mg/dl), doch zeigten eine Leukozytose und wiederholte Temperaturen bis zu 39 ^{o}C rezidivierende Abstoßungsreaktionen an. Deshalb wurde die Therapie um das niedrig dosierte Azathioprin erweitert (Tripeltherapie), obwohl dadurch das Risiko gegenüber Infektionen und der Bildung von malignen Lymphomen (vorwiegend Non-Hodgkin-Lymphome und Retikulum-Sarkom) wesentlich erhöht wurde.

Bereits 3 Wochen nach Umstellung der Therapie zwangen rezidivierendes Fieber, Leukopenie (1900 Zellen/mm^3), eine Thrombozytose (740 000 Zellen/mm^3) und ein Anstieg des Kreatinins auf 3,6 mg/dl vorübergehend zum Absetzen von Azathioprin. Obwohl es nicht gelang, einen positiven Virusnachweis über die Fibroblastenkultur aus Urin bzw. aus Sputum zu führen, sprach die Symtomatik am ehesten für eine Infektion mit Cytomegalie-Virus bei immunsuppressiver Therapie. Nach 14 Tagen hatte die Nierenfunktion den für das Transplantat ty-

pischen Wert von ca. 2.5 mg Kreatinin/dl wieder erreicht. Leukozyten und Thrombozyten befanden sich annähernd im Normbereich.

Immerhin war festzustellen, daß bis zur letzten erfaßten Untersuchung 7 Monate nach Transplantation mit der Dreifachtherapie aus niedrig dosiertem Azathioprin und langsam ausschleichender Medikation mit Ciclosporin A und Steroiden eine Stabilisierung der Funktionswerte des Transplantats auf 2,8 mg Kreatinin/dl und 40 mg Harnstoff/dl erreicht werden konnte. Eine Leukopenie trat nicht wieder auf.

Aufgrund der 6 Abstoßungsreaktionen während des Beobachtungszeitsraumes war die Prognose des Transplantats fraglich, insbesondere in Zusammenhang mit dem akuten Nierenversagen bei Cytomegalie-Virus-Infektion und Leukopenie. Die vorliegenden Meßwerte der Leukotrienausscheidung im Urin wiesen sowohl summarisch als auch tendenziell eine Verschiebung zugunsten des gefäßaktiven LTC_4 auf (durchschnittlich 80 ng LTC_4/Tag zu 77 ng LTB_4/Tag). Während der Tage unmittelbar nach Transplantation, d.h. unter der initial hohen intravenösen steroidalen Medikation, hat das Verhältnis aus LTB_4 zu LTC_4 Werte größer als 1,0.

Zwei Tage vor der ersten klinisch diagnostizierten Abstoßungsreaktion (7. postoperativer Tag) wurde der genannte Quotient kleiner als 1,0 und stieg am Ende der Behandlung mit 3 x 250 mg Prednisolon auf 1,0 und mehr an. Die Mehrausscheidung von LTB_4 war jedoch erneut nur von kurzer Dauer, so daß mit Ausnahme eines Versuchstages der Quotient beider Leukotriene unter 1,0 lag. Insgesamt fand sich in über 70 % der Proben dieses Patienten mehr LTC_4 als LTB_4.

Im weiteren postoperativen Verlauf wurde noch zweimal Prednisolon verabreicht. Wie schon weiter oben angesprochen war es nicht möglich, eine befriedigende Nierenfunktion kurz-

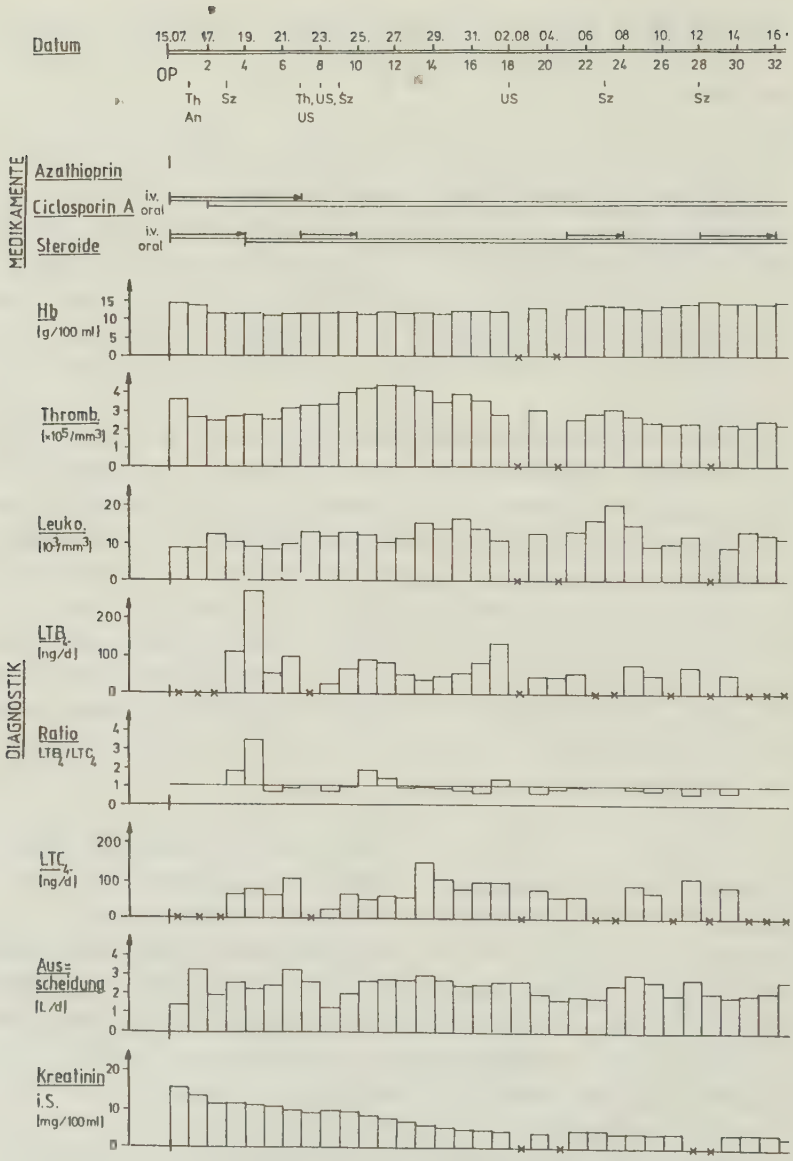
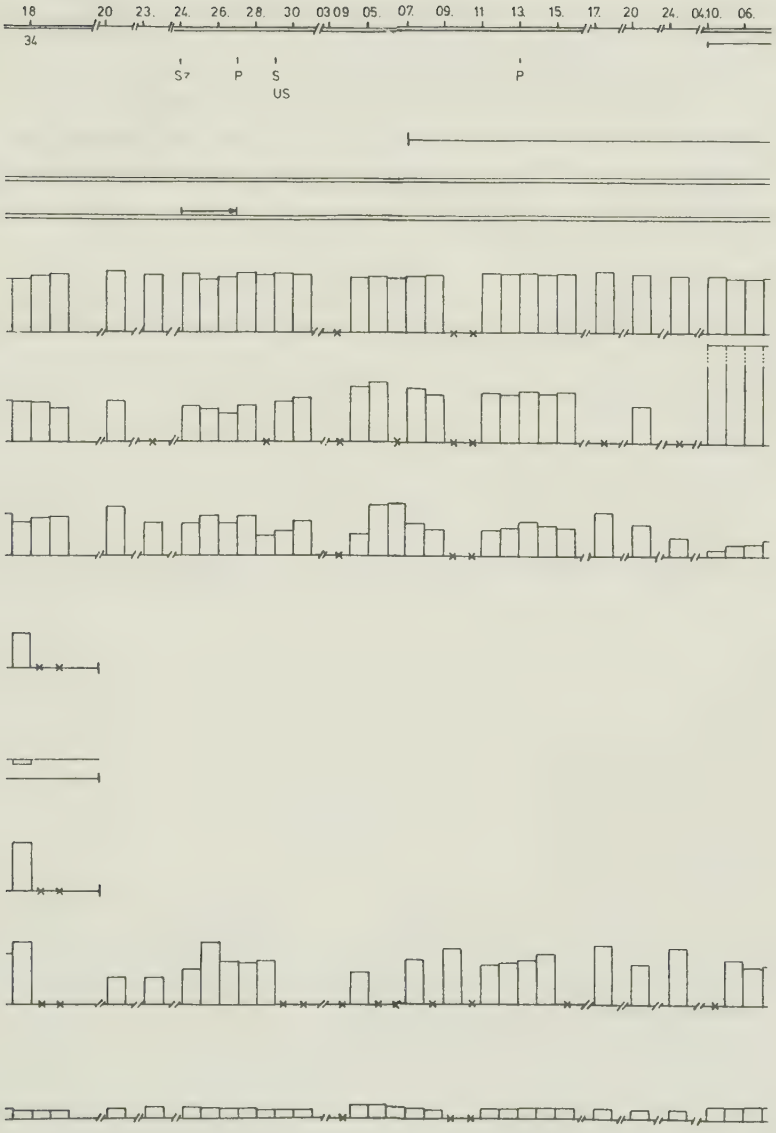
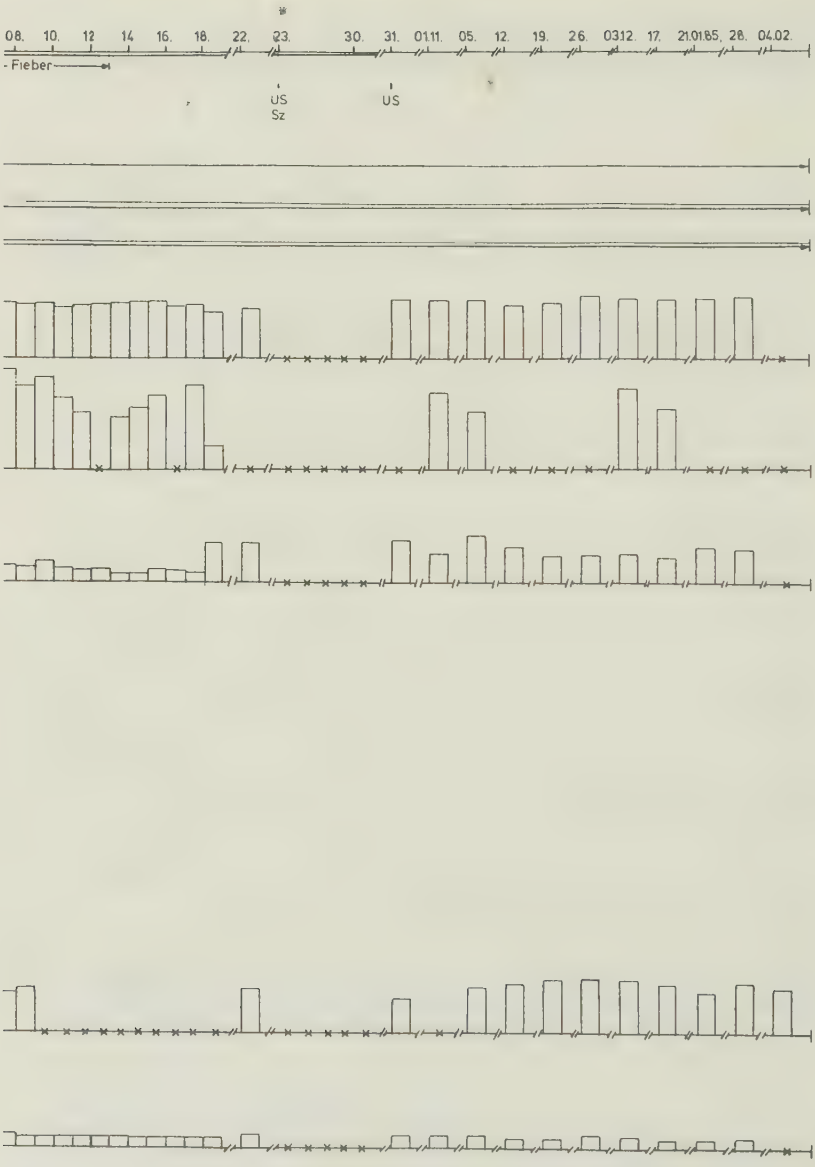


Abb. 41: Patient 5, 48 Jahre.


18
20
23.
24.
26.
28.
30
03
09
05.
07.
09.
11
13.
15.
17.
20
24.
04.
10.
06.
34
S?
P
S
US
P


08. 10. 12 14 16. 18. 22. 23. 30. 31. 01.11. 05. 12. 19. 26. 03.12. 17. 21.01.85. 28. 04.02.
- Fieber
US
Sz
US

fristig oder auf Dauer sicherzustellen. Entsprechend lag der Durchschnittswert des Quotienten aus LTB_4 und LTC_4 unter 1,0. In diesem Fall stand ein ungünstiger Verlauf mit rezidivierenden Abstoßungsreaktionen und intercurrenten Infektionen im Zusammenhang mit einer überwiegenden Ausscheidung des Sulfidopeptid-Leukotriens LTC_4.

4.2.6. Patient 6, 47 Jahre

Wegen beidseitiger Zystennieren war der Patient seit 1 Jahr dialysepflichtig. Als relatives Operationsrisiko war eine koronare Herzerkrankung anzusehen. Der Patient erhielt die linke Niere eines 17-jährigen polytraumatisierten Patienten. Ergebnis der HLA-Typisierung:

Spender:	A 1		(10) A 25			Bw 4	Bw 6		B 8			
Empfänger:		A 3			Aw 31 (19)	Bw 4	Bw 6	B 7		B 13		

Spender:	Cw 1		Cw 7	DRw 1	DRw 2
Empfänger:		Cw 6		DRw 1	DRw 2

Die immunsuppressive Behandlung wurde primär mit Azathioprin, Anti-Thymozytenglobulin und Steroiden durchgeführt, perioperativ zusätzlich mit CMV-Hyperimmunglobulin. Das Transplantat zeigte eine gute Spontanfunktion, so daß das Kreatinin innerhalb von 9 Tagen von 9,1 mg/dl auf 1,7 mg/dl und der Harnstoffgehalt von 41 mg/dl auf 23 mg/dl zurückging. Auch szintigraphisch war die Nierenfunktion gut. Eine anfängliche Leukozytose beruhte auf einem Harnwegsinfekt. Die Thrombozyten lagen konstant im Normbereich. Hingegen zeichnete sich bis zur Entlassung eine mäßige Anämie ab.

Die bestehende Medikation aus Azathioprin, Anti-Thymozytenglobulin und oralen Steroiden wurde unter ambulanten Bedingungen bei stabiler Nierenfunktion fortgesetzt. Als Warnsymptom erschien allerdings retrospektiv ein fehlender weiterer Rückgang des Kreatinins. Vielmehr kam es nach 4 Wochen zu einem Kreatininanstieg auf mehr als 4 mg/dl und weiteren Zeichen einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion mit begleitendem akuten Nierenversagen. Mit 2 Zyklen hochdosierter Steroide, unter Fortsetzung der Gabe von ATG sowie durch Verbesserung der Diurese gelang es, das Kreatinin auf 2,8 mg/dl und den Harnstoffgehalt auf 49 mg/dl abzusenken.

Kurz darauf kam es erneut zu einem fieberhaften Infekt. Klinisch imponierten eine beidseitige basale Pneumonie und eine Meningo-Encephalitis bei Leukopenie (300 Zellen/mm^3) sowie eine Hb-wirksame gastrointestinale Blutung bei Thrombozytopenie (60 000 Zellen /mm^3). Der Zustand des Patienten verschlechterte sich binnen weniger Tage derart, daß eine intensivmedizinische Betreuung mit kontrollierter Beatmung und Notfallendoskopie notwendig wurde. Als Ursache der Symptomatik war trotz perioperativer Abschirmung mit Cytomegalie-Hyperimmunglobulin eine reaktivierte Infektion mit Cytomegalie-Virus anzusehen. Unter multipler antibiotischer Abdeckung und der Therapie mit Aciclovir erholte sich der Patient langsam, so daß nach 3 Monaten eine Dreiertherapie mit Ciclosporin A, Steroiden und Azathioprin durchgeführt werden konnte. Als Residualzustand der Meningo-Encephalitis bestand jedoch weiter eine ausgeprägte Polyneuropathie mit distal betonten Atrophien und Paresen sowie einem Burning-Feet-Syndrom.

Ein Vierteljahr nach diesem akuten Ereignis lagen erstmals wieder Beobachtungen aus der Transplantatambulanz vor. Daraus war zu erschließen, daß die Funktion der Niere völlig wiederhergestellt war (Kreatinin 1,6 mg/dl, Harnstoff 20 mg/dl). Alle anderen hämatologischen Parameter befanden sich ebenfalls im Normbereich.

Die während des unmittelbar postoperativen stationären Aufenthalts erzielten Meßwerte für beide Leukotriene im Urin, insbesondere der Quotient aus beiden Metaboliten, zeigten einen eindeutigen Überschuß von Leukotrien C_4 ($LTB_4/LTC_4 < 0{,}9$). Es wird zu diskutieren sein, ob dieses Merkmal als Warnhinweis aufzufassen war, selbst wenn der Rückgang der Retentionswerte noch eine anders lautende Tendenz aufwies. Leider ließ sich dieser Trend nicht weiter verfolgen, da die anschließenden stationären Aufenthalte seitens der Leukotrien-Ausscheidung im Urin nicht erfaßt wurden.

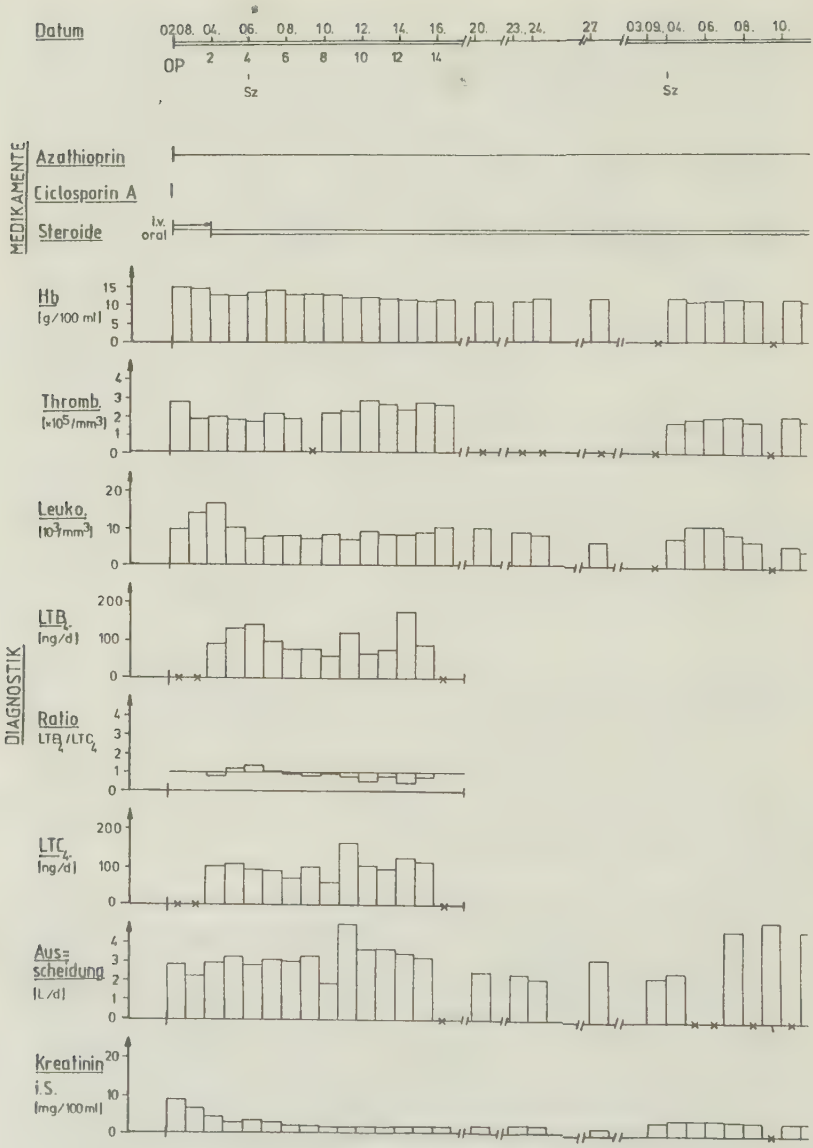
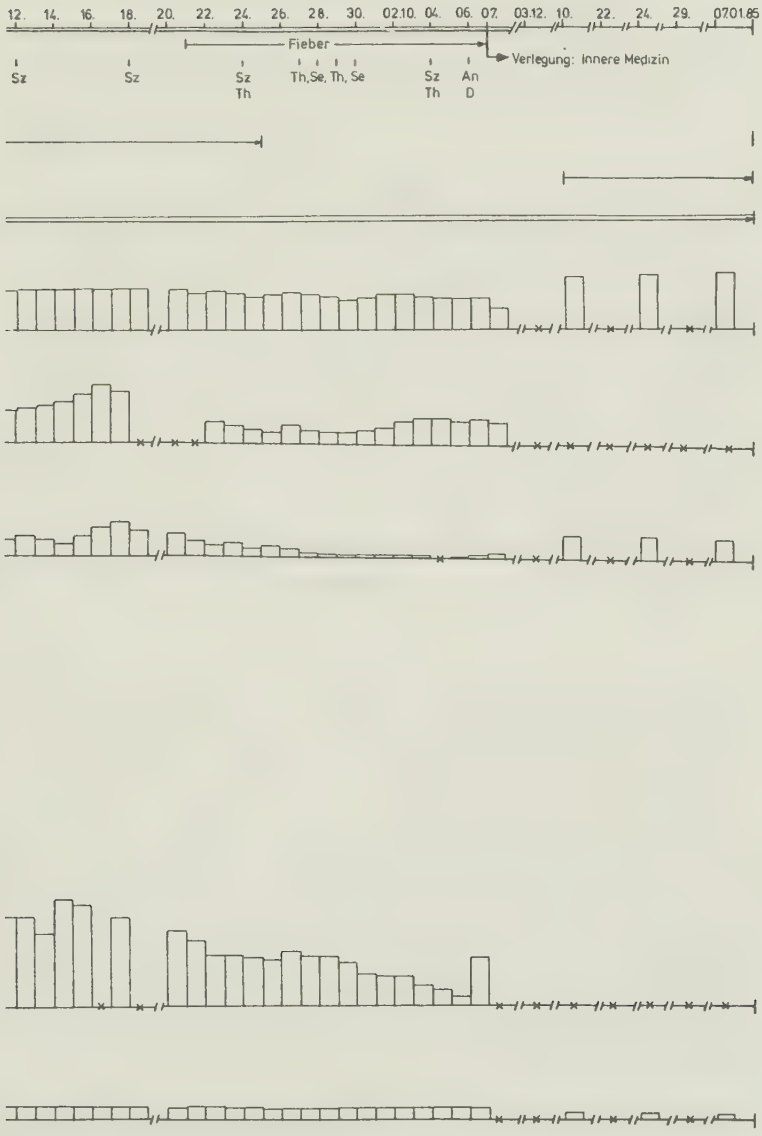


Abb 42: Patient 6, 47 Jahre.


12. 14. 16. 18. 20. 22. 24. 26. 28. 30. 02.10. 04. 06. 07. 03.12. 10. 22. 24. 29. 07.01.85
Fieber
Verlegung: Innere Medizin
Sz
Sz
Sz
Th
Th,Se, Th, Se
Sz
Th
An
D

4.2.7. Patient 7, 49 Jahre

Bei dem Patienten bestand seit 7 Jahren eine dialysepflichtige terminale Niereninsuffizienz als Folge einer chronischen Pyelonephritis. Gleichzeitig lag eine renale Osteopathie und Anämie vor, in deren Rahmen der Patient zwei Mal transfundiert wurde. Das Spenderorgan stammte von einem 30-jährigen Mann, der sich 6 Tage vor der Organentnahme ein schweres Schädel-Hirn-Trauma zugezogen hatte. Die HLA-Typisierung lautete:

Spender:	A 2		A 10	B 7	B 12		Bw 44	DRw 1	DRw 2
Empfänger:	A 2	A 3	A 10		B 12	B 27	Bw 44	DRw 1	DRw 2

Bei einem Ausgangs-Kreatinin von 9.0 mg/dl nahm die transplantierte Niere ihre Funktion sofort auf, so daß postoperativ nicht mehr dialysiert werden mußte. Die Immunsuppression wurde mit Azathioprin, Prednisolon und Anti-Thymozyten-Globulin durchgeführt. Unter dieser Therapie fielen die Retentionswerte nach 3 Wochen auf 1,7 mg Kreatinin/dl bzw. 29 mg Harnstoff/dl ab.

Am 26. postoperativen Tag zeigte sich eine Funktionsverschlechterung der Transplantatniere. Szintigraphisch war ein kleiner Perfusionsausfall am oberen Pol der Niere zu erkennen. Klinisch kam es zu einem Rückgang der Urinausscheidung mit entsprechender Verschlechterung des Kreatinins. Eine Leukozytose bestand nicht. Histologisch handelte es sich um eine mittelschwere chronische interstitielle Abstoßungsreaktion. Über sechs Tage wurde deshalb eine hochdosierte Steroid-Therapie durchgeführt, worauf das Kreatinin von 3,6 mg/dl wieder auf Werte unter 2,0 mg/dl abfiel. Die tägliche Urinausscheidung verbesserte sich ebenfalls.

Fraglich blieb der Zusammenhang zwischen dieser Abstoßungsreaktion und einer zwei Tage zuvor durchführten Transfusion von 2 Erythrozytenkonzentraten, die wegen einer Anämie von

zuletzt 6,2 g Hämoglobin/dl notwendig erschien. Aus der plasmatischen und zellulären Gerinnungssituation ergab sich kein Anhalt für ein embolisches Geschehen, so daß allenfalls eine immunologische Reaktion denkbar gewesen wäre.

Insgesamt gab es während des stationären Aufenthalts keine foudroyanten Abstoßungsreaktionen mit deutlichen klinischen und laborchemischen Zeichen, so daß sich die Transplantatfunktion zunehmend stabilisierte. Die gute Übereinstimmung zwischen Spenderorgan und Empfänger drückte sich u.a. auch im Quotienten zwischen LTB_4 und LTC_4 aus, der an allen Meßtagen größer als 1,0 war (LTB_4/LTC_4 zum Teil größer 6,0, sonst um 2,0). Aus technischen Gründen konnte leider nicht der gesamte postoperative Verlauf untersucht werden, so daß die Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 während bzw. unmittelbar vor der Abstoßungsreaktion nicht erfaßt wurde.

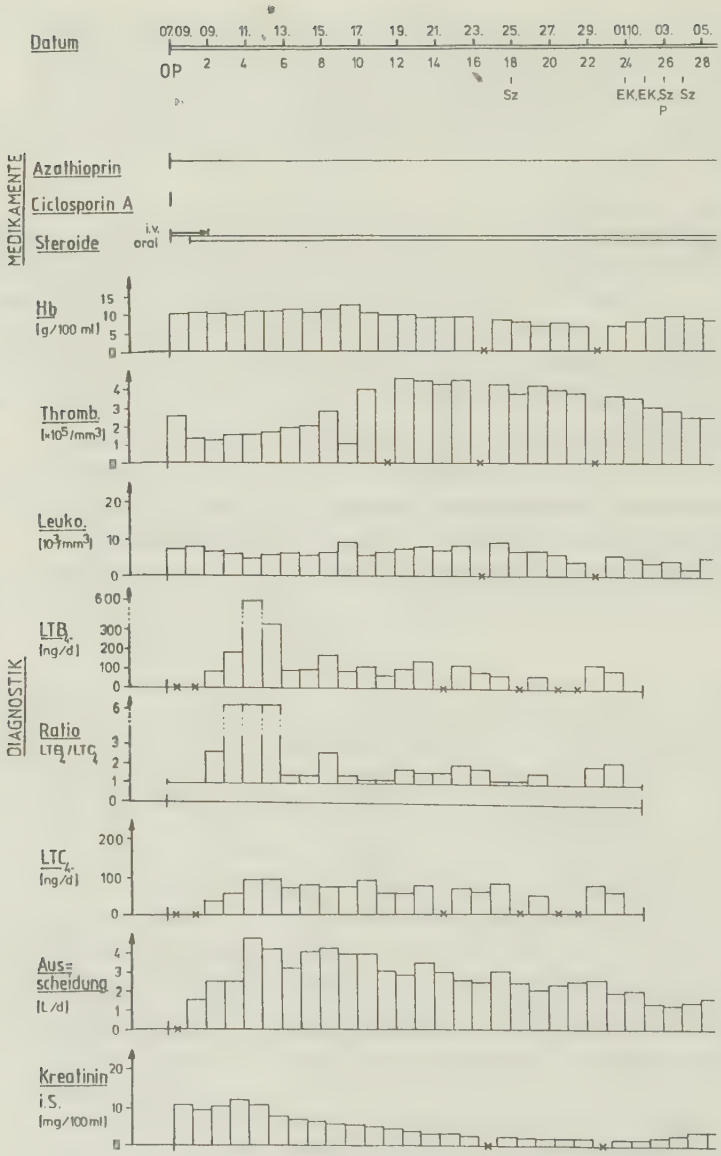
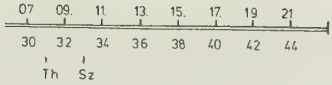
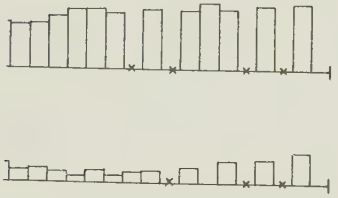
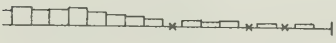


Abb. 43: Patient 7, 49 Jahre.


07 09. 11 13. 15. 17 19 21
30 32 34 36 38 40 42 44
Th Sz





4.2.8. Patient 8, 47 Jahre

Bei dem Patienten bestand wegen einer chronischen Glomerulonephritis seit 1 Jahr eine dialysepflichtige terminale Niereninsuffizienz. Das Spenderorgan stammte von einem 16 Jahre alten Mann, der den Folgen eines Kopfdurchschusses erlag. Die Gewebetypisierung lautete:

Spender:	A 3	A 11		A 29	Bw 4	Bw 6	B 7		Bw 44
Empfänger:		A 11	A 25				B 7	B 18	

Spender:	DRw 2	
Empfänger:	DRw 2	DRw 7

Intraoperativ zeigte sich bei dem Empfänger eine massive Arteriosklerose der Beckenarterien, so daß der arterielle Anschluß nur nach Endarteriektomie der Arteria iliaca communis durchgeführt werden konnte. Die Immunsuppression erfolgte mit Steroiden, Azathioprin und Anti-Thymozyten-Globulin.

Postoperativ wies die Transplantatniere zunächst eine gute Funktion auf. Innerhalb einer Woche fielen die Retentionswerte von 13,5 mg Kreatinin/dl auf 2,1 mg/dl bzw. von 80 mg Harnstoff/dl auf 35 mg/dl. Am 8. postoperativen Tag entwickelte sich allerdings eine Abstoßungsreaktion unter den klinischen Zeichen von Fieber und einem mäßigen Anstieg der Retentionswerte. Daraufhin wurden Steroide verabreicht. Unter dieser Therapie sank das Kreatinin rasch auf Werte um 1,8 mg/dl ab und blieb bis zur Entlassung konstant. Die Nierendurchblutung war szintigraphisch gut. Im Ultraschall ergab sich kein Anhalt für eine Abstoßungsreaktion oder ein akutes Nierenversagen.

Auffallend war bei dem Patienten die ausgeprägte renale Anämie mit einem Hämoglobingehalt von zuletzt 5,7 g%, das nach Transfusion zweier leukozyten- und thrombozytenarmer Erythrozyten-Konzentrate auf 8,6 g% angehoben werden konn-

te. Die immunsuppressive Therapie vertrug der Patient gut, es kam nicht zu einer Leukopenie. Auf die Gabe von 3 x 250 mg Prednisolon stiegen die Thrombozyten kurzfristig an, die Zellzahl blieb aber stets im Normbereich.

Während der späteren ambulanten Kontrollen, die in diesem Fall bis zum Zeitpunkt 2 Monate nach Transplantation dokumentiert waren, stellte sich die Nierenfunktion unverändert gut dar. Wegen des Verdachts einer reaktivierten Infektion mit Cytomegalie-Virus wurden 3 x 150 ml CMV-Hyperimmunglobulin gegeben. Insgesamt zeichnete sich für das Transplantat aber eine günstige Prognose ab.

Die Meßwerte der beiden Leukotriene waren bei diesem Patienten leider ungenügend dokumentiert, es lagen nur 7 Beobachtungen vor. Dennoch bestand in allen Fällen ein deutlicher Überschuß von LTB_4 gegenüber LTC_4. Wie bei den voraus besprochenen Patienten erreichte der Quotient aus LTB_4 zu LTC_4 stets größere Werte als 1,0.

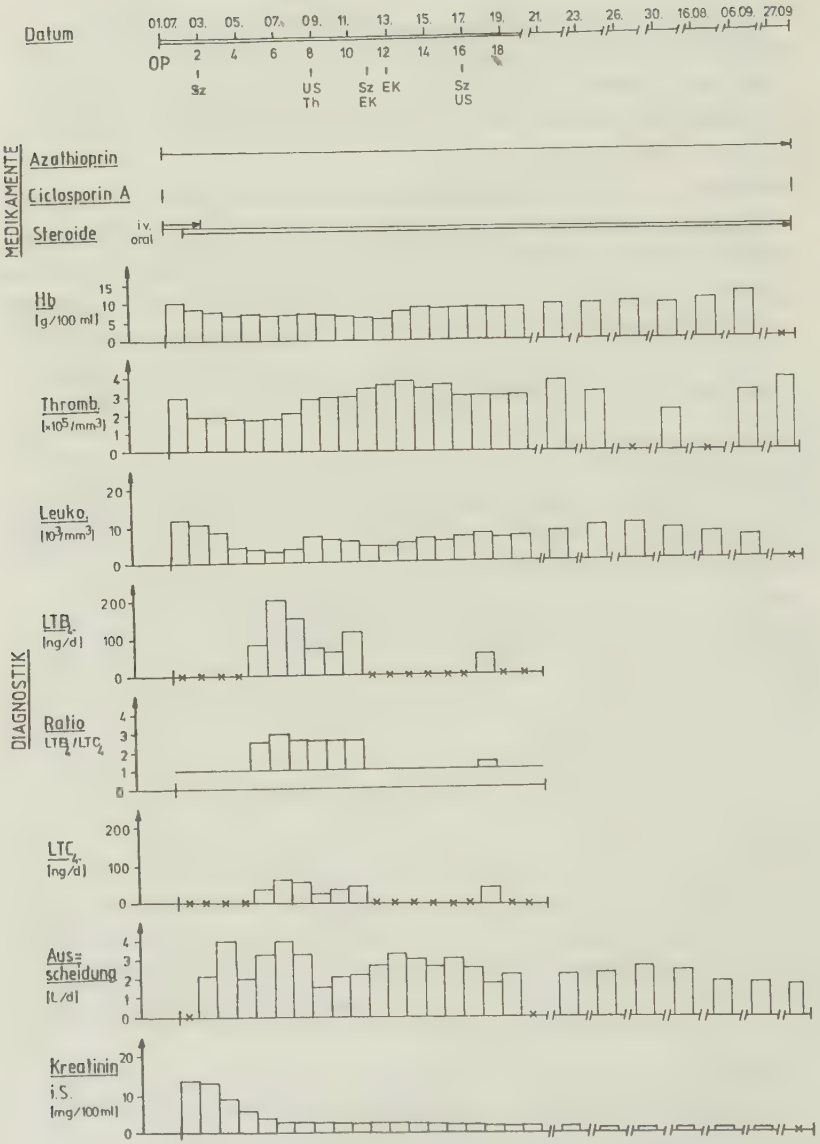


Abb. 44: Patient 8, 47 Jahre.

4.2.9. Patient 9, 22 Jahre

Bei dem Patienten lag ein Prune-Belly-Syndrom vor (Bauchdeckenaplasie mit Megaureter und beidseitiger Hydronephrose). In mehreren Sitzungen wurden beide Harnleiter modelliert und mittels Anti-Reflux-Plastik neu in die Blase eingepflanzt. Gleichzeitig erfolgte die Rekonstruktion der Bauchwand. In der Folgezeit kam es links zu einem Reflux Grad 2 -3, rechts zu einem Reflux surprise. Daraufhin entwickelte sich eine terminale Niereninsuffizienz aufgrund beidseitiger pyelonephritischer Schrumpfnieren mit Kreatininwerten von 18 mg/dl. Zugleich bestanden eine urämische Pericarditis, eine renale Anämie und eine Hypertonie. Eine aktuelle kinderurologische Voruntersuchung ergab keine Kontraindikationen gegen eine Nierentransplantation. Deshalb erhielt der Patient die Niere eines 17-jährigen Spenders, der an den Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas gestorben war. Die HLA-Typisierung lautete:

Spender:		A 3		Bw 4		Bw 6	Bw 38		
Empfänger:	A 1	A 2		A 26		B 5		Bw 44 (12)	Bw 62 (15)

Spender:	Cw 1			DRw 6	DRw 7
Empfänger:		Cw 3	Cw 4	DRw 6	DRw 7

Trotz der zahlreichen Voroperationen war die Implantation des Spenderorgans in typischer Weise möglich. Eine immunsuppressive Therapie mit Steroiden, Azathioprin und Anti-Thymozyten-Globulin wurde begonnen. Bei einem Ausgangskreatinin von 10,1 mg/dl kam es postoperativ zu einem akuten Nierenversagen, so daß zunächst dialysiert werden mußte. Als weitere Komplikation trat am 6. postoperativen Tag eine Nachblutung in die Tranplantatloge auf. Bei der anschließenden Revision fand sich eine Ruptur des Transplantats, die operativ versorgt werden konnte. Wegen der Nachblutungsgefahr bei weiteren Hämodialysen wurde in gleicher Sitzung ein Peritonealkatheter implantiert und am folgenden Tag mit der Peritonealdialyse begonnen. Die histologische Untersuchung eines intraoperativ gewonnenen Stanzzylinders

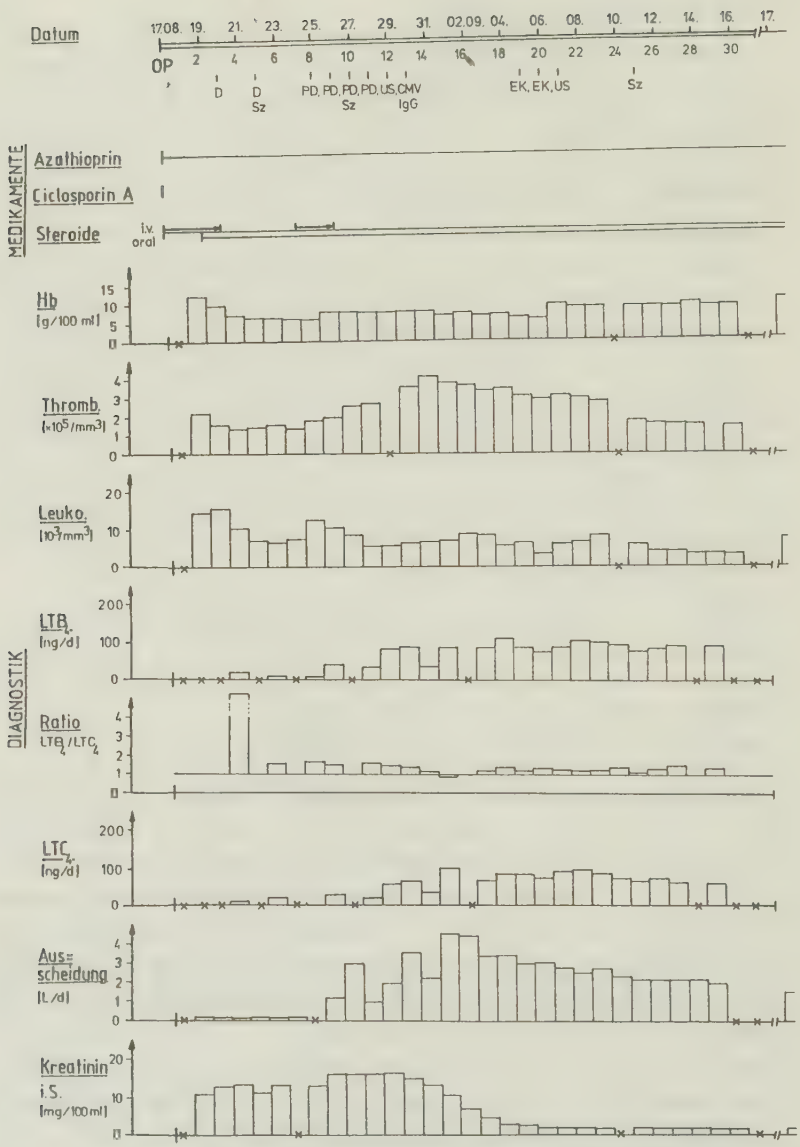
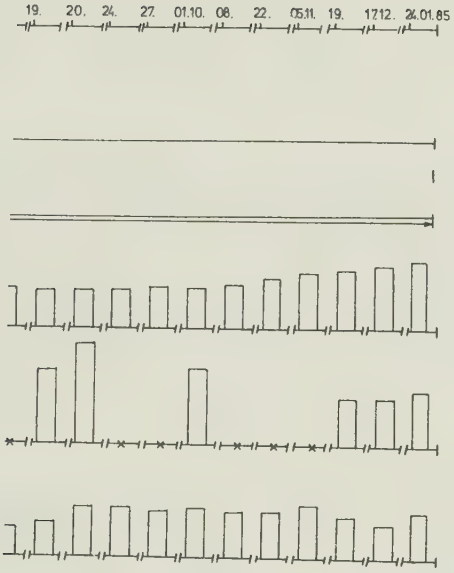
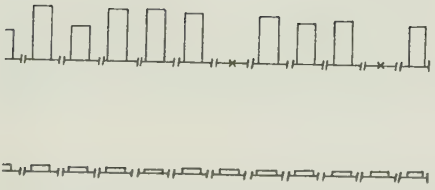


Abb. 45: Patient 9, 22 Jahre.


19. 20. 24. 27. 01.10. 08. 22. 05.11. 19. 17.12. 24.01.85



aus der Tranplantatniere wies kein Zeichen einer Abstoßung auf, sondern bestätigte die Diagnose eines akuten Nierenversagens.

Im Anschluß an die operative Revision kam eine ausreichende Urinproduktion der Transplantatniere in Gang, so daß ab dem 11. postoperativen Tag keine Peritonealdialyse mehr notwendig war. Das Kreatinin sank innerhalb einer Woche auf weniger als 2.0 mg/dl ab. Bis zur Entlassung am 30. postoperativen Tag verbesserte sich die Nierenfunktion zusehends, so daß schließlich Kreatininwerte im Normbereich gemessen wurden. Während der ambulanten Kontrollen blieb der Befund konstant.

Bei der Betrachtung des Blutbildes fiel die Leukozytose auf, die genau auf den Zeitraum des akuten Nierenversagens begrenzt war. Die Anämie verstärkte sich zunächst noch und wurde durch zwei Erythrozyten-Konzentrate teilweise ausgeglichen. Etwa 1 1/2 Monate nach Transplantation erreichte schließlich das rote Blutbild wieder Normalwerte.

Mit einer einzigen Ausnahme wurde im Urin täglich mehr LTB_4 als LTC_4 ausgeschieden (LTB_4/LTC_4 stets größer als 1,0). Die Meßwerte beider Substanzen stiegen ab der Mitte der 3. postoperativen Woche an, zu einem Zeitpunkt, an dem die reaktive Polyurie rückläufig war und die Leukozyten Normalwerte aufwiesen. Der Quotient aus LTB_4 zu LTC_4 erreichte am 15. postoperativen Tag mit 0,86 den niedrigsten gemessenen Wert. Der Durchschnittswert für den Quotienten der Urinausscheidung von LTB_4 zu LTC_4 betrug 1,29 und steht im Zusammenhang mit einer stabilen Nierenfunktion.

4.2.10. Patient 10, 49 Jahre

Vor 6 Jahren wurde anläßlich des Verdachts auf eine Quecksilbervergiftung eine Proteinurie und szintigraphisch eine verminderte Nierendurchblutung nachgewiesen. 4 Jahre später wurde im Zusammenhang mit einer Hämaturie, einer Proteinurie und einer präterminalen Niereninsuffizienz die Diagnose einer chronischen Glomerulonephritis gestellt. Nach Anlage eines Cimino-Shunts begann zwei Jahre vor Transplantation die chronische Hämodialyse. Das Spenderorgan stammte von einer 17-jährigen polytraumatisierten Patientin. Das Ergebnis der HLA-Typisierung lautete:

Spender:	A 2	A 3	Bw 4		Bw 44				Cw 5
Empfänger:	A 2	A 3	Bw 4	Bw 6		Bw 51 (5)	Bw 62 (15)	Cw 3	

Spender:	DRw 4	
Empfänger:	DRw 4	DRw 8

Intraoperativ war die Niere nach Freigabe der Anastomosen teilweise minderdurchblutet. Die Urinausscheidung kam nur zögernd in Gang. Eine Immunsuppression mit Ciclosporin A und Steroiden wurde begonnen. Wegen des primären akuten Nierenversagens waren 4 Hämodialysebehandlungen notwendig. Ab dem 10. postoperativen Tag zeigte die Transplantatniere eine ausreichende Spontanfunktion, wobei das Serumkreatinin bis zur Entlassung schrittweise von maximal 11,3 mg/dl auf 2,6 mg/dl absank. Während der nachfolgenden ambulanten Kontrollen war unter weiterer Zurücknahme der täglichen Dosis an Ciclosporin A und Steroiden nur noch eine geringfügige Besserung zu erzielen (Kreatinin 2,0 mg/dl, Harnstoff 33 mg/dl). Klinische oder laborchemische Anhalte für eine Abstoßungsreaktion ergaben sich zu keinem Zeitpunkt. Szintigraphisch war die Nierendurchblutung gut.

Wie schon mehrfach beobachtet trat auch bei diesem Patienten eine das akute Nierenversagen begleitende mäßige Leukozytose auf, die am Ende der stationären Behandlung wieder

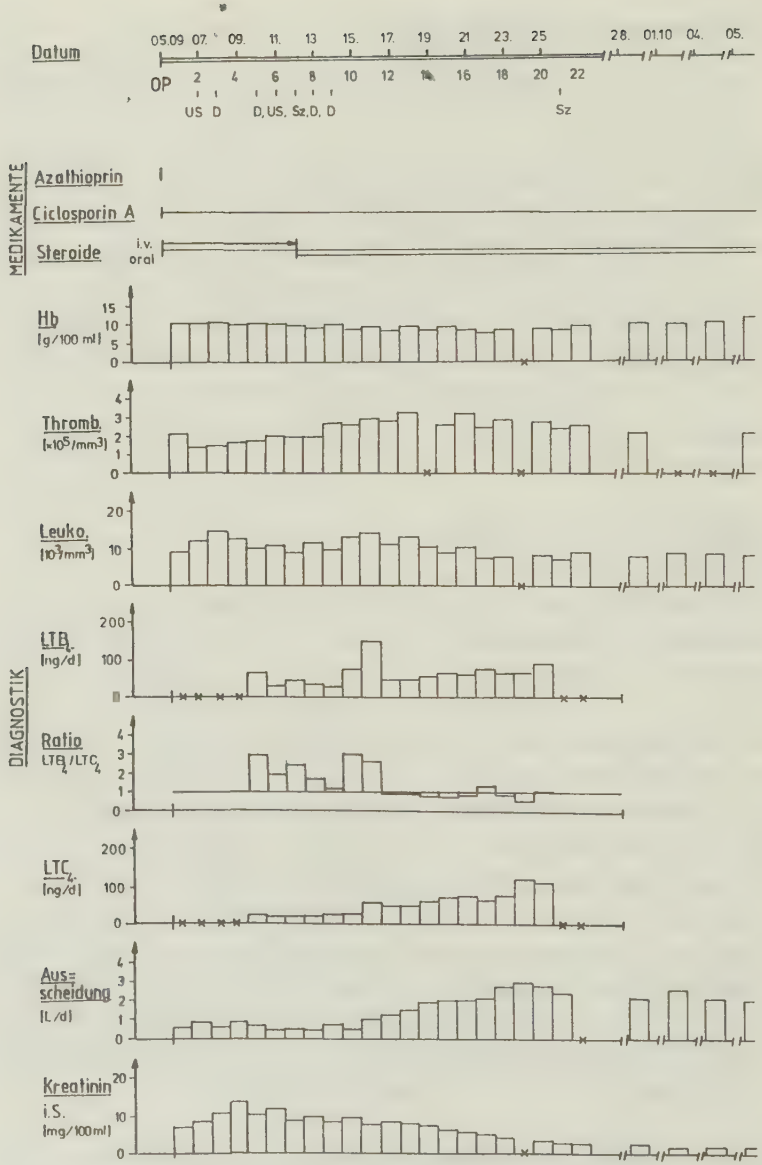
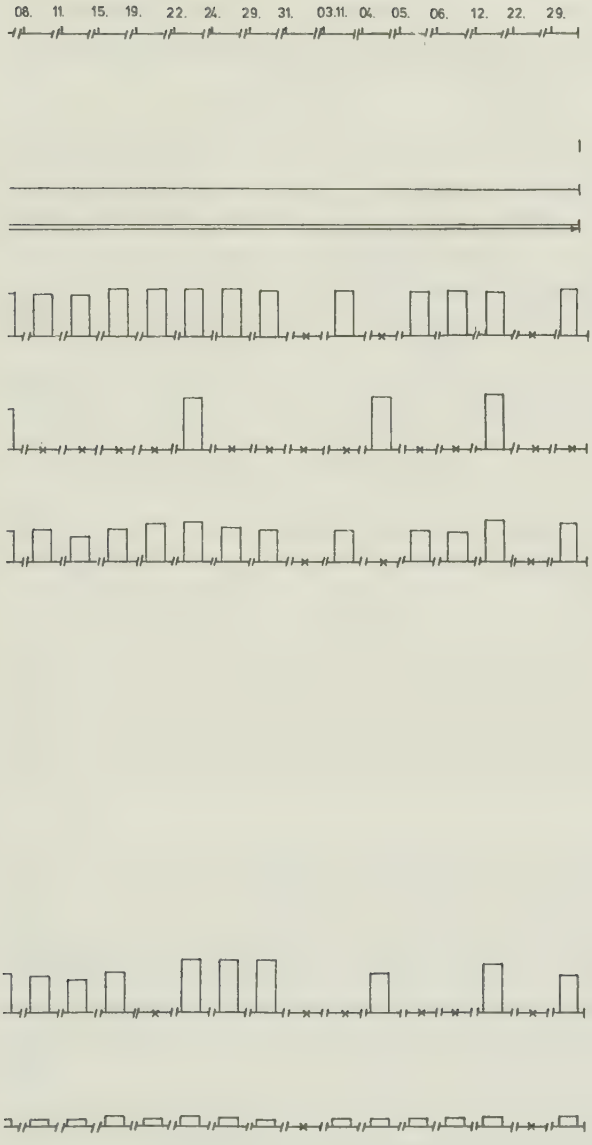


Abb. 46: Patient 10, 49 Jahre.


08. 11. 15. 19. 22. 24. 29. 31. 03.11. 04. 05. 06. 12. 22. 29.

verschwand. Nach einer Latenzphase von etwa 2 Monaten war ein kontinuierlicher Anstieg der Hämoglobinkonzentration im Blut bemerkbar.

Hinsichtlich der Leukotriendiagnostik ergab sich ein zweigeteiltes Bild. Unmittelbar postoperativ überwog LTB_4 (LTB_4/LTC_4 zwischen 2,0 und 3,0). Mit einsetzender Spontanfunktion der Transplantatniere wurden zunächst gleich große Mengen beider Leukotriene und dann ein leichter Überschuß an LTC_4 festgestellt. Insgesamt lag das Verhältnis aus LTB_4 zu LTC_4 bei 1,57. Es fiel jedoch auf, daß dieser Wert während der zweiten Hälfte des stationären Aufenthalts stets weniger als 1,0 betrug.

4.2.11. Patient 11, 37 Jahre

Seit 9 Jahren mußte der Patient wegen einer terminalen Niereninsuffizienz infolge einer chronischen Glomerulonephritis hämodialysiert werden. Zudem war ein vesicorenaler Reflux 2. Grades auf der rechten Seite bekannt. Es bestanden außerdem Hinweise auf eine koronare Herzkrankheit und auf eine Polyneuropathie. Das Spenderorgan stammte von einer 29-jährigen Frau, die an einer Subarachnoidalblutung verstarb. Das Ergebnis der HLA-Typisierung lautete:

Spender:	A 1	A 11		B 8	Bw 35	B 37	DRw 1	DRw 4
Empfänger:	A 1		Bw 6		Bw 35		DRw 1	DRw 4

Die Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger war gut. Die Immunsuppression wurde mit Ciclosporin A und Steroiden durchgeführt. Die Urinproduktion kam zunächst nur zögernd in Gang, so daß bis zum 7. postoperativen Tag insgesamt dreimal dialysiert werden mußte. Anschließend begann eine reaktive Polyurie, worunter das Kreatinin von 10,3 mg/dl auf 1,3 mg/dl und der Serumharnstoff von 81 mg/dl auf 25 mg/dl absank. Die gute Nierenfunktion mit Clearance-Raten zwischen 50 und 60 ml/min. blieb während des weiteren Beobachtungszeitraumes von fünf Monaten stabil.

Erneut war das postoperativ eingetretene akute Nierenversagen von einer mäßigen leukozytären Reaktion begleitet, die sich bis zur Entlassung normalisierte. Aufgrund dieser günstigen Entwicklung konnten die Gaben an Ciclosporin A und an Steroiden rasch auf minimale Erhaltungsdosen reduziert werden. Die Anämie renaler Ursache besserte sich rasch.

Wie beim vorausgehenden Patienten bestand initial eine erhöhte Ausscheidung von LTB_4 gegenüber LTC_4. Dieses Übergewicht änderte sich kurzfristig zugunsten von LTC_4. Alle

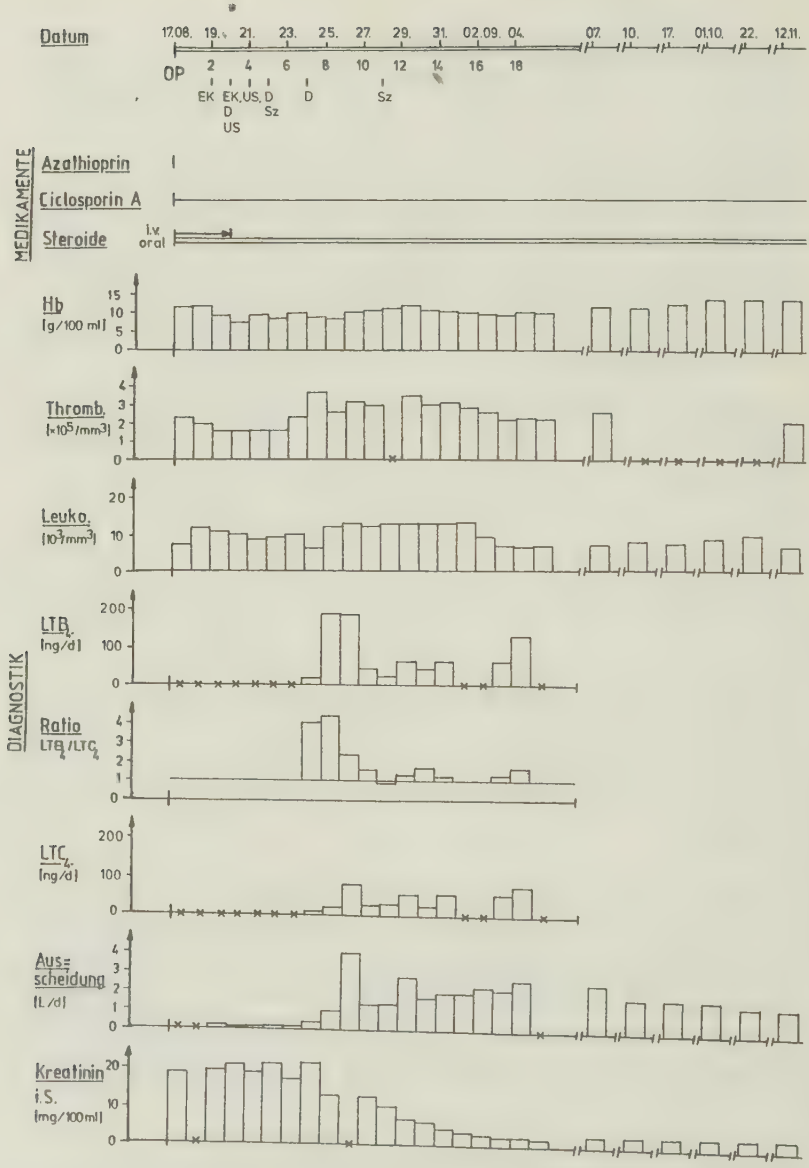
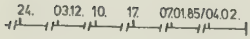
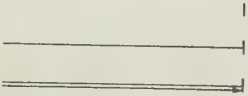
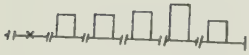
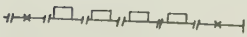


Abb. 47: Patient 11, 37 Jahre.


24. 03.12. 10. 17. 07.01.85/04.02.







folgenden Verhältniswerte waren wiederum größer als 1,0. Die geschilderten Schwankungen verliefen parallel zur Urinausscheidung. In der anfänglichen polyurischen Phase war überwiegend LTB_4 nachweisbar, bei Rückgang der Diurese dominierte LTC_4. Offenbar spiegelte sich bei diesem Patienten die Filterleistung der Transplantatniere unmittelbar in den Daten der Leukotrienbestimmungen wieder, die wiederum im Zusammenhang mit einem Wechsel der Applikation und Dosierung des Ciclosporin A standen. Bei diesem Patienten gingen eine akzeptable Senkung der Retentionswerte mit steigenden Meßwerten zugunsten von LTB_4 einher.

4.2.12. Patient 12, 54 Jahre

Seit 30 Jahren war bei dem Patienten eine Hypertonie bekannt, die zu beiderseitigen Schrumpfnieren geführt hatte. Vier Jahre vor der jetzigen Transplantation dekompensierte die Niereninsuffizienz, so daß die Dialysebehandlung begonnen werden mußte. Zum gleichen Zeitpunkte kam eine Penicillin-Allergie hinzu, die eine toxische Panzytopenie verursachte. Trotz dieser Risiken erhielt der Patient im Frühjahr vor zwei Jahren eine Transplantatniere, die wegen wiederholter schwerer Abstoßungsreaktionen nach wenigen Monaten wieder entfernt werden mußte. Im gleichen Jahr traten nach einem viralen Infekt eine Hepatitis und Pankreatitis auf, die von chronischen Durchfällen begleitet waren. Nach zwischenzeitlicher Rekonstitution des Patienten wurde 2 1/2 Jahre nach der Ersttransplantation eine erneute Organübertragung befürwortet. Die Spenderniere stammte von einem 17-jährigen Unfalltoten mit Schädel-Hirn-Trauma. Das Ergebnis der Gewebetypisierung lautete:

Spender:		A 11		B 7	B 27				DRw 1
Empfänger:	A 3	A 11	Bw 6	B 7		Bw 35	Cw 4	Cw 7	DRw 1
Spender:	DRw 2								
Empfänger:	DRw 2								

Primär von Nachteil war, daß bei dem Organspender wegen einer protrahierten Schocksymptomatik das Kreatinin bei zuletzt guter Asscheidung 2,8 mg/dl betrug. Außerdem waren die Laborwerte des Empfängers so ungünstig, daß vor Operation eine Akutdialyse durchgeführt werden mußte. Dadurch verlängerte sich im Vergleich zu den übrigen Transplantationspatienten die kalte Ischämiezeit. Deshalb wurde initial eine Therapie mit Steroiden und Ciclosporin A begonnen.

Neue Komplikationen ergaben sich unmittelbar postoperativ durch eine oberflächliche Blutung, die eine Revision er-

forderlich machte. Daraufhin kam die Urinausscheidung zwar gut in Gang (Abfall des Kreatinins von 13,6 mg/dl auf 2.8 mg/dl innerhalb einer Woche), doch trat bereits am 7. postoperativen Tag eine Abstoßungsreaktion auf, die zunächst mit 3 x 250 mg Prednisolon behandelt wurde. Unmittelbar darauf wurde eine neue Abstoßung vermutet. Da mit Steroiden nur ein Absinken des Kreatinins von 4.3 mg/dl auf 2,9 mg/dl zu erzielen war, wurde zusätzlich Anti-Thymozyten-Globulin gegeben. Unter dieser Therapie sanken die Lymphozyten jedoch so rasch ab, daß diese Behandlung abgebrochen werden mußte. Immerhin gelang es schließlich, eine immunologische Toleranz zu erreichen, wobei die Niere mit 1,4 mg Kreatinin/dl und 24 mg Harnstoff/dl eine ideale Funktion zeigte.

Eineinhalb Monate nach der Transplantation kam es erneut zu einem Kreatininanstieg auf 2,8 mg/dl begleitet von allen klinischen Zeichen einer Abstoßungsreaktion. Histologisch fand sich eine geringgradige interstitielle Abstoßung in Verbindung mit einem milden akuten Nierenversagen. Nach Gabe von zweimal 250 mg Prednisolon ging das Kreatinin auf 1,7 mg/dl und der Harnstoff auf 41 mg/dl zurück. Kurz darauf mußte der Patient wieder unter dem Verdacht einer Abstoßungsreaktion stationär aufgenommen werden. Zwar wurde keine Nierenbiopsie durchgeführt, doch sprach die Nierenfunktion gut auf die Gabe von dreimal 250 mg Prednisolon an. Das Kreatinin sank rasch von 3,5 mg/dl auf 1,9 mg/dl ab.

Unter dem Eindruck der wiederholten Abstoßungsreaktionen wurde nun eine Dreifachtherapie bestehend aus Azathioprin, Ciclosporin A und einem Steroid begonnen. Bei weiteren kurzfristigen ambulanten Kontrollen war die Niere szintigraphisch gut durchblutet. Wenige Tage nach der Umstellung der Therapie stieg das Kreatinin erneut auf 2,8 mg/dl an, woraufhin wiederum mit Steroiden behandelt wurde. Nach ei-

ner oligurischen Phase zu Beginn steigerte sich das Urinvolumen, so daß die Kreatininwerte bis zur Entlassung geringfügig bis auf 2,2 mg/dl absanken und dort stabil blieben.

Wegen der rezidivierenden und ätiologisch unklaren Anstiege des Kreatinins wurde der Patient in der Folgezeit engmaschig überwacht. Eine wesentliche Änderung der Nierenfunktion ergab sich für diesen Zeitraum nicht. Drei Monate nach der Transplantation stieg der Hämoglobingehalt langsam auf ca. 13 g/dl an. Parallel dazu besserte sich die grenzwertige Thrombozytopenie auf Werte zwischen 150 000 und 250 000 Zellen/mm^3. Unter dem Einfluß der immunsuppessiven Medikation lagen die Leukozytenzahlen fast immer im unteren Normbereich. Wegen des erhöhten Infektionsrisikos bei niedrigen Lymphozytenwerten wurde auf eine Behandlung mit Ciclosporin A, Steroiden und Azathioprin in minimaler Einzeldosierung umgestellt, die sich auf die Transplantatakzeptanz günstig auswirkte.

Die tägliche Ausscheidung der Leukotriene betrug zwischen 25 und 150 mg LTB_4 sowie zwischen 38 und 250 mg LTC_4. Die ersten verfügbaren Meßwerte stammten vom 3. und 4. postoperativen Tag. Hier wurde zunächst deutlich mehr LTB_4 als LTC_4 ausgeschieden. Während der darauffolgenden Tage kehrte sich der Quotient jedoch zu gunsten von LTC_4 um. Nur während der zweimaligen Abstoßungsbehandlung ändert sich das Verhältnis zwischen den beiden Metaboliten kurzfristig. Anschließend verschob sich der Quotient von LTB_4 zu LTC_4 erneut in Richtung auf Werte unter 1,0.

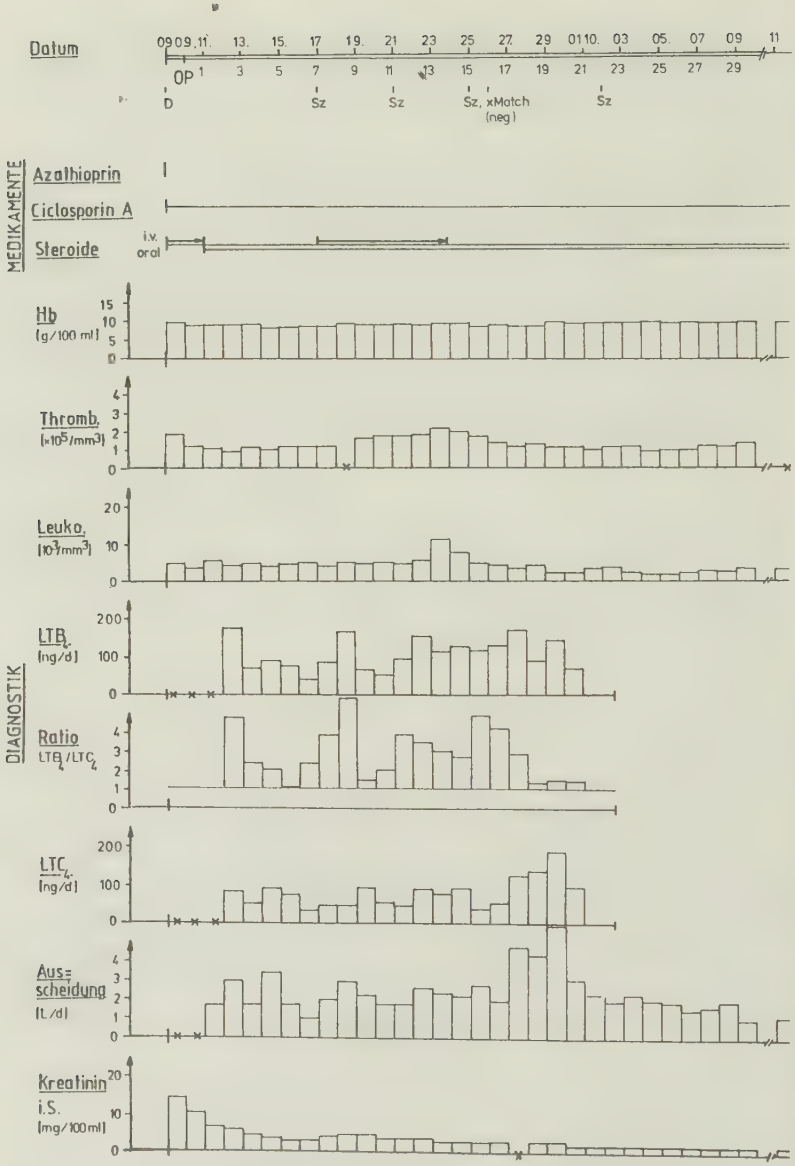
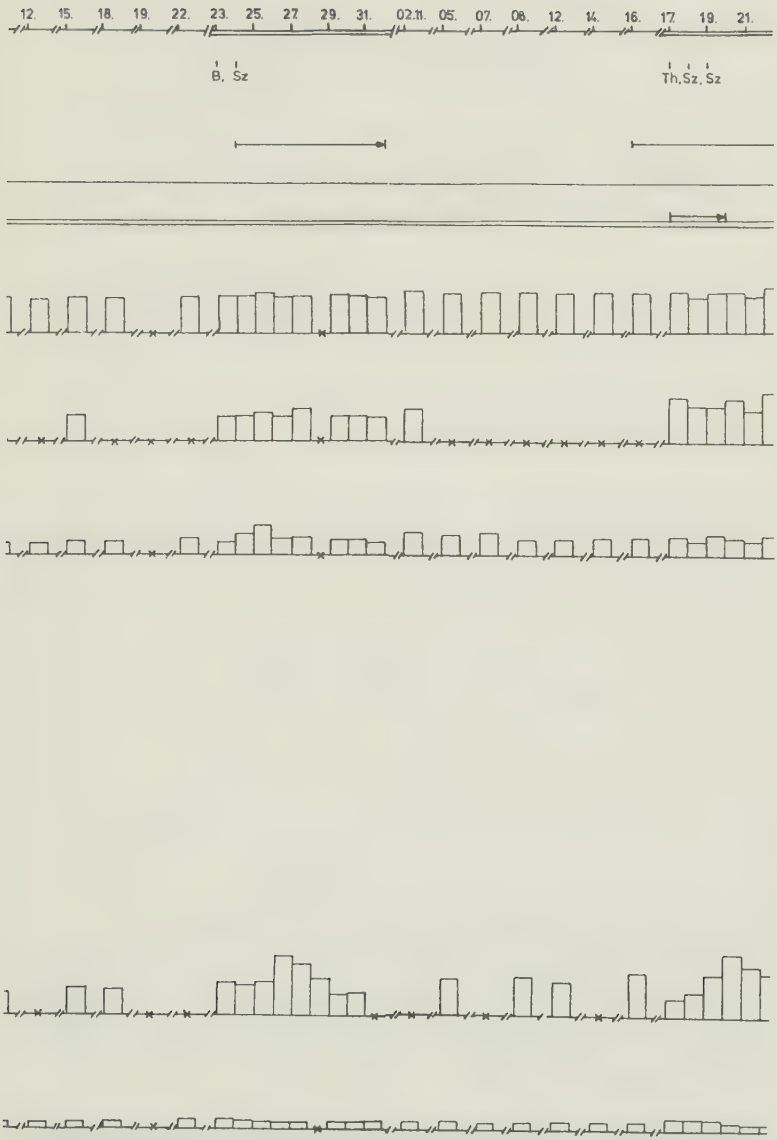
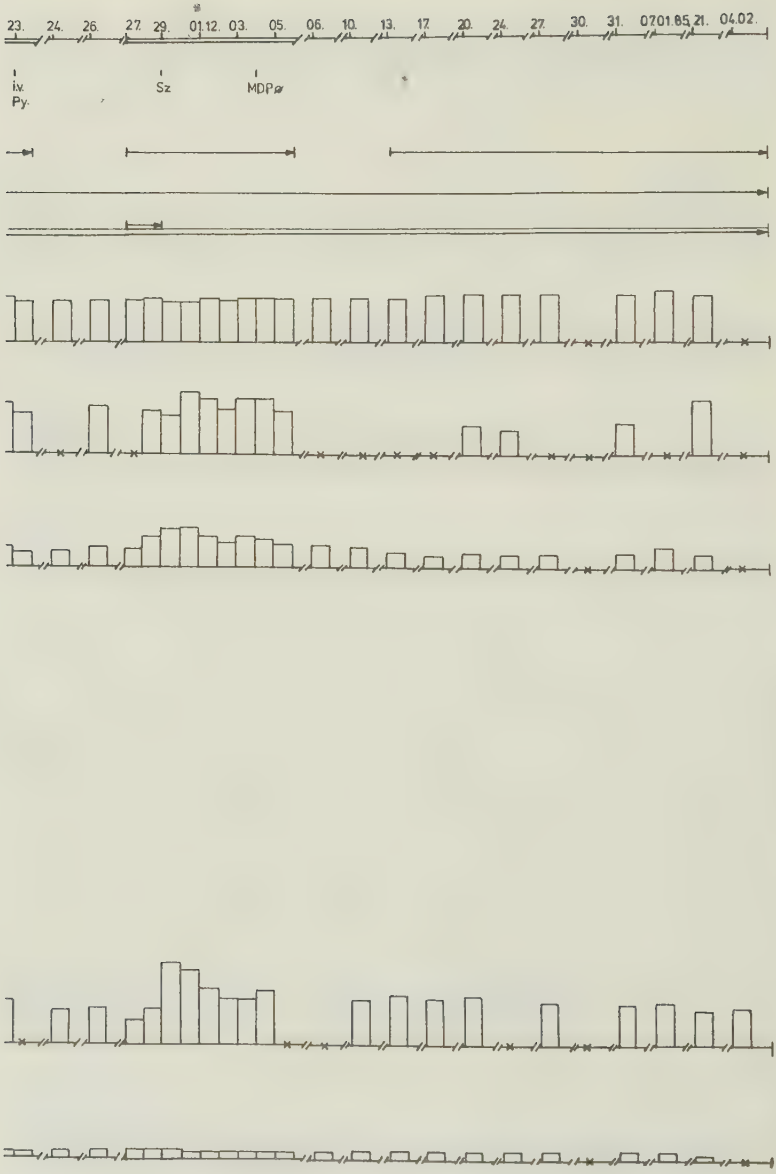


Abb. 48: Patient 12, 54 Jahre.


12. 15. 18. 19. 22. 23. 25. 27. 29. 31. 02.11. 05. 07. 08. 12. 14. 16. 17. 19. 21.
B, Sz
Th,Sz, Sz


23. 24. 26. 27. 29. 01.12. 03. 05. 06. 10. 13. 17. 20. 24. 27. 30. 31. 0701.85 21. 04.02.
i.v.
Py.
Sz
MDP

4.3. Zusammenfassung der Daten über Patienten in der akuten Phase nach Nierentransplantation

Diese Gruppe setzte sich aus 3 Frauen und 9 Männern zusammen. Der Jüngste von ihnen war 16, der Älteste 57 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 43 1/2 ± 12 1/2 Jahre (Abb. 49).

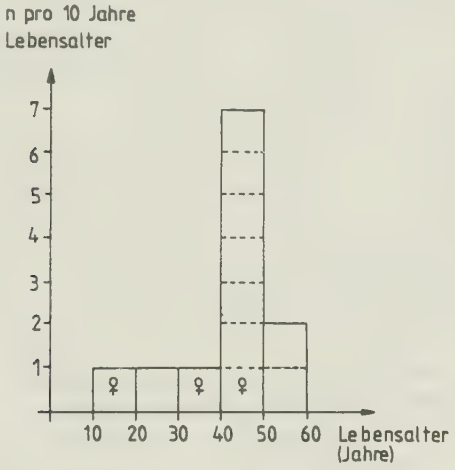


Abb. 49: Histogramm Altersverteilung.

Die dialysepflichtige Niereninsuffizienz bestand zwischen 6 Monaten und 9 Jahren, im Mittel seit mehr als 4 Jahren (Abb. 50). In 5 Fällen stellte eine chronische Pyelonephritis die Ursache des terminalen Nierenversagens dar. Ebenso oft lautete die Diagnose chronische Glomerulonephritis, je einmal wurde Zystennieren bzw. interstitielle Nephritis angegeben. Ein Patient hatte eine Transplantatabstoßung einschließlich Explantation in der Anamnese vorzuweisen.

Aufgrund ihres unterschiedlich eingeschätzten Abstoßungsrisikos wurden primär 8 Patienten neben Steroiden mit Azathioprin als zweite Säule der Immunsuppression behandelt. We-

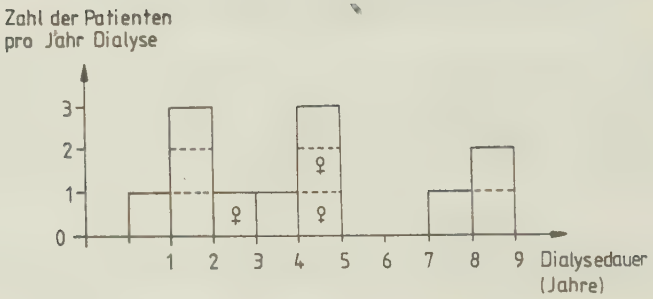


Abb. 50: Histogramm Dialysedauer.

gen wiederholter, zum Teil schwerer Abstoßungskrisen mußte diese Standard-Zweier-Therapie in drei Fällen um Ciclosporin A erweitert werden. Bei einer Patientin wurde Azathioprin durch Ciclosporin A ersetzt (Abb. 51).

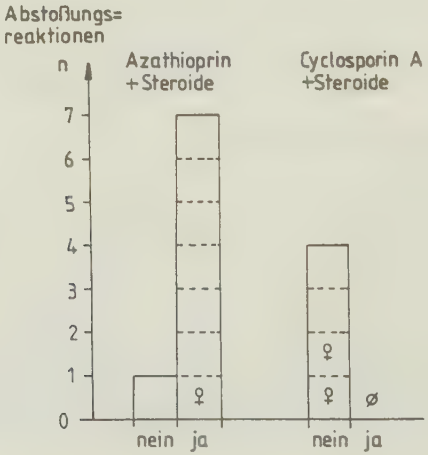


Abb. 51: Histogramm zu Abstoßungsreaktionen unter der Therapie mit Azathioprin bzw. Ciclosporin A als Initialtherapie in Kombination mit Steroiden.

Die übrigen 4 Patienten bekamen primär die Kombination aus Steroiden und Ciclosporin A, wobei eine nachträgliche Umstellung der Medikation nicht erfolgen mußte. Am Ende des Beobachtungszeitraumes standen nur noch 4 Patienten unter einer reinen Azathioprin/Steroid-Therapie.

Die Erhaltung des transplantierten Organs war bei der Hälfte der mit der Standard-Therapie behandelten Patienten eine zwingende Indikation zur Erweiterung oder gänzlichen Umstellung der Medikation. Im Anschluß an diese Maßnahme änderte sich die Immunitätslage derart, daß eine hinreichende Toleranz des Empfängers gegenüber dem Transplantat erreicht wurde und sich die zumeist deutlich beeinträchtigte Nierenfunktion wieder erholte.

Während der ersten Wochen nach Nierentransplantation kam es am ehesten zu Abstoßungsreaktionen (Abb. 52).Dies war

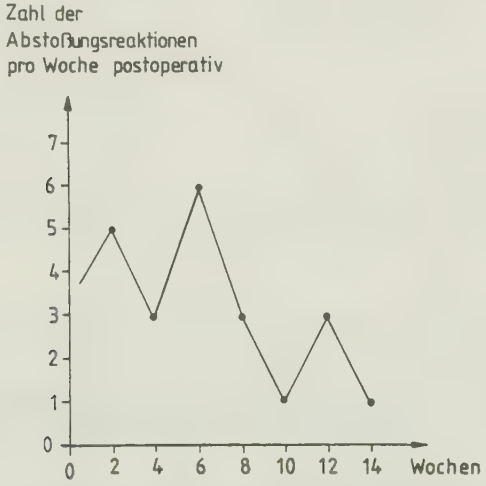


Abb. 52: Zahl der postoperativ diagnostizierten und behandelten Abstoßungsreaktionen pro Woche im Anschluß an die Nierentransplantation.

bei 7 Patienten der Fall, davon bei dreien in erheblichem Ausmaß (3 - 7 Abstoßungsreaktionen). Zur Erhaltung des Organs mußte kurzfristig und hochdosiert mit injizierbaren Steroiden behandelt werden. Von den insgesamt diagnostizierten Abstoßungsreaktionen ereigneten sich weitaus die meisten in den ersten 8 Wochen nach Transplantation, die übrigen gegen Ende des Behandlungszeitraumes. Die frühen Abstoßungsreaktionen traten entweder innerhalb der beiden ersten Wochen auf oder aber etwas verzögert zwischen der 4. und 8. Woche. Die späten Abstoßungsreaktionen fanden sich insbesondere in der 12. Woche. Eine zeitliche Zuordnung zum Schweregrad des immunologischen Geschehens war nicht möglich (zu kleine Patientenzahl, individueller Verlauf zu variabel).

Die Anzahl der Abstoßungsreaktionen pro Patient differierte sehr. Bei zwei Drittel der Patienten trat während des untersuchten Zeitraums keine oder maximal eine Abstoßungsreaktion auf. Dazu gehörten, wie bereits erwähnt, alle Patienten mit Ciclosporin A als primärer immunsuppressiver Therapie (Abb. 53). Alle übrigen Patienten hatten zwei und mehr Abstoßungsreaktionen zu verzeichnen. Die Medikation mußte bei dieser Risikogruppe, die sich insofern eindeutig von den anderen Transplantatempfängern abgrenzte, um Ciclosporin A zu einer Dreifachtherapie (maximales Therapieschema) erweitert werden.

Die postoperativ auftretenden Komplikationen kamen natürlich auch in der Dauer des/der stationären Aufenthalts/Aufenthalte zum Ausdruck. Analog zum eben Gesagtem lag bei Patienten mit geringer Zahl an Abstoßungsreaktionen die Liegezeit mehr oder weniger deutlich unter 50 Tagen (Abb. 54). Dementsprechend länger erstreckte sich die klinische Behandlung der Patienten mit erhöhter Zahl an Abstoßungsreaktionen. Die 3 Patienten der höchsten Risiko-

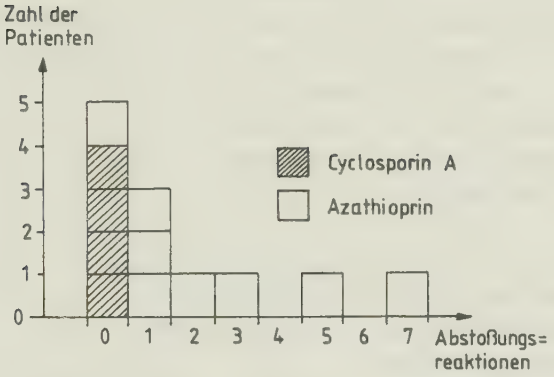


Abb. 53: Anzahl der Abstoßungsreaktionen pro Patient in Abhängigkeit von der immunsuppressiven Medikation.

gruppe (stationäre Verweildauer von mehr als 50 Tagen) mußten zwischen zwei und viermal erneut zur Behandlung einer Abstoßungsreaktion stationär aufgenommen werden.

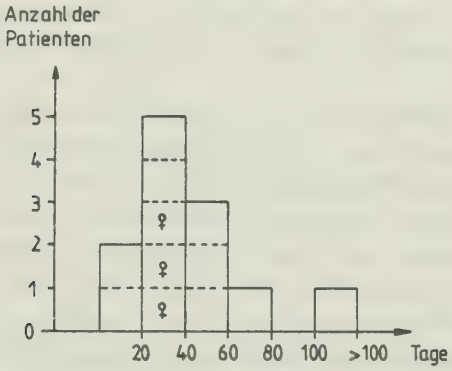


Abb. 54: Histogramm zur Dauer des stationären Aufenthalts unmittelbar postoperativ und zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen im weiteren Verlauf.

Drei der übrigen Patienten wurden je ein Mal nach ihrer Entlassung erneut unter stationären Bedingungen therapiert. Sie gehörten ausschließlich der Gruppe an, die initial mit Azathioprin behandelt wurde. 50% der Nierentransplantierten, die in dieser Stichprobe untersucht wurden, kamen ohne stationäre Nachbehandlung aus. Dazu gehörten alle Patienten, die primär Ciclosporin A erhielten.

Bei den 3 Patienten mit komplikationsreichem Verlauf kamen folgende Risikofaktoren zum Tragen:

1) hohes Lebensalter des Organspenders,
2) lange Dialysezeit,
3) Zweittransplantation,
4) Infektion mit Cytomegalie-Virus und
5) Probleme während der Dialysebehandlung, die eine Erhöhung des Serumkreatinins bewirkten.

Andererseits gelang es, bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes ein Kreatinin von 1,6 - 1,8 mg/dl zu erreichen. Das entsprach dem Mittelwert aller anderen Patienten, deren postoperativer Verlauf komplikationsärmer war. Der Patient mit den meisten Abstoßungsreaktionen wies allerdings den höchsten Serumkreatinin-Endwert auf (2,8 mg Kreatinin/dl).

Stellt man die entsprechenden Endwerte des Serumkreatinins der mit Azathioprin bzw. mit Ciclosporin A behandelten Patientengruppen einander gegenüber (1,7 mg/dl bzw. 2.1 mg/dl), so wurde der Vorteil einer geringeren Zahl an Abstoßungsreaktionen offenbar mit einer schlechteren Funktion des Transplantats erkauft (Abb. 55). Wie im Abschnitt der Einzeldarstellungen schon besprochen, kam es bei allen Patienten unter Ciclosporin A in der Initialphase nach Organtransplantation zu einem akuten Nierenversagen.

Aus der Differenz der Serumkreatinin-Werte unter Hämodialysebedingungen und bei stabilisierter Transplantatfunktion ließ sich ebenfalls die Leistungfähigkeit des über-

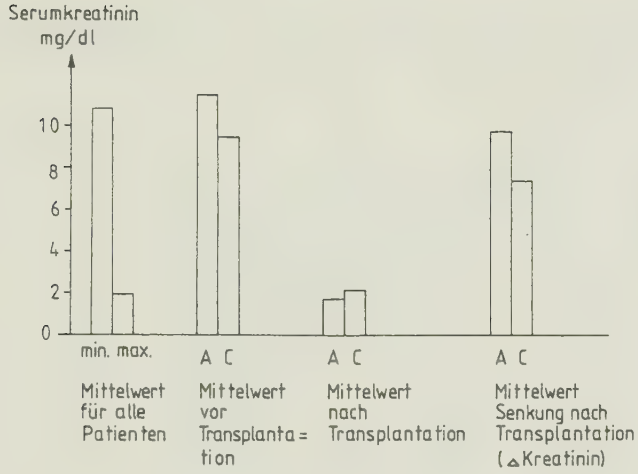


Abb. 55: Kreatininspiegel vor bzw. nach Transplantation.
A: mit Azathioprin.
B: mit Ciclosporin A.

tragenen Organs ablesen. Die durchschnittliche Verbesserung des Serumkreatinins betrug bei Patienten unter Azathioprin-Therapie 9,7 mg/dl, bei Patienten unter Ciclosporin A-Therapie jedoch nur 7,3 mg/dl. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Patienten unter Azathioprin zunächst höhere Kreatininwerte aufweisen als die Gruppe mit Ciclosporin A.

Es wurde bereis vermutet, daß die Ausscheidung der beiden Leukotriene im Urin, insbesondere aber das Verhältnis von LTB_4 und LTC_4 zueinander ein Merkmal darstellte, aus dessen unmittelbarer postoperativer Konstellation eine prognostische Aussage abzuleiten war. Es zeigte sich, daß bei allen Patienten, die gehäuft Abstoßungskrisen zu überstehen hatten, der Quotient aus $LTB_4/LTC_4 \leq 1{,}00$ betrug,

wohingegen der entsprechende Wert derjenigen Patienten, die wenige oder gar keine Abstoßungsreaktionen aufwiesen, entsprechend größer war. Anschaulich kommt dies in der Abb. 56 zum Ausdruck.

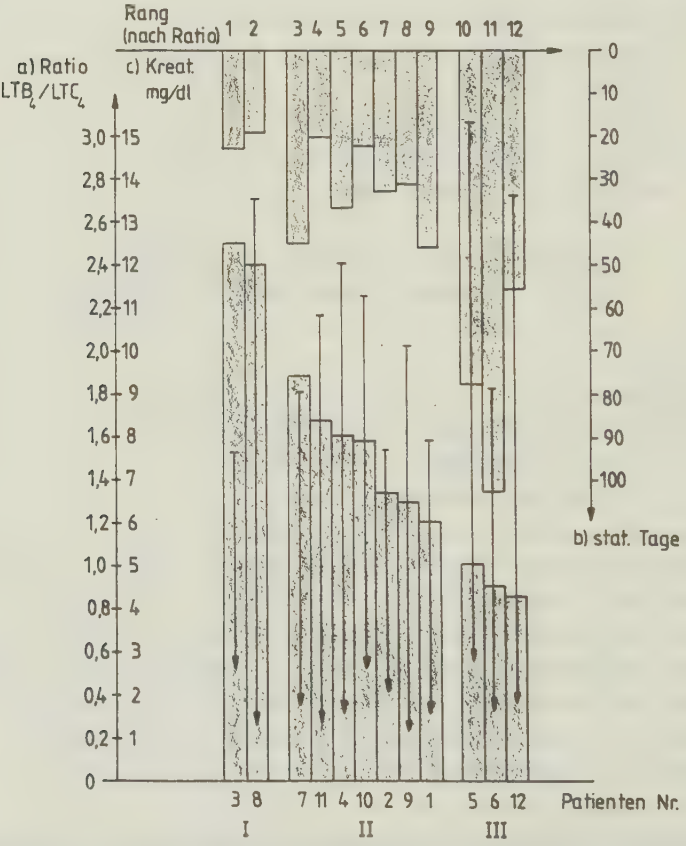


Abb. 56: Korrelation der Ausscheidung der Leukotriene, der stationären Aufenthaltsdauer und der Verbesserung im Serumkreatinin.

a) Patienten geordnet nach Ratio LTB_4/LTC_4.

b) Zahl der Tage in stationärer Behandlung.

c) Kreatinin mg/dl vor und nach Transplantation (Pfeile innerhalb der Ratio-Säulen von oben nach unten).

(I, II, III siehe Tabelle 11).

Numerisch am ehesten erfassen ließen sich ein komplikationsreicher Verlauf neben der Zahl der dokumentierten Abstoßungsreaktionen anhand der stationären Behandlungstage. Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen hinsichtlich dieser Merkmale waren augenfällig. Die Kreatininwerte vor der Transplantation unterschieden sich bei den beiden erstgenannten nicht, hoben sich jedoch etwas von der Gruppe III ab. Der Mittelwert des Ausgangs-Kreatinins von 12,7 mg/dl deutete an, daß hier von vornherein größere Risiken zu erwarten waren als bei den anderen Patienten (Risikogruppe). Das Resultat der Nierenfunktion am Ende des Untersuchungszeitraumes war für alle drei Gruppen mehr oder weniger identisch und lag im Bereich einer kompensierten Retention, wobei die Risikogruppe das schlechteste Schlußergebnis aufwies. Überraschend jedoch war, daß der am Kreatininabfall gemessene Behandlungserfolg bei dieser Gruppe am größten ist (Tab. 11).

Bei den Patienten aus Gruppe I und II wurden gleich häufig Azathioprin bzw. Ciclosporin A zur initialen immunsuppressiven Behandlung eingesetzt. Nur einmal war hier ein Absetzen der Therapie von Azathioprin zugunsten von Ciclosporin A notwendig. In der Risikogruppe jedoch mußte nach wiederholten Abstoßungsreaktionen stets zusätzlich zu Azathioprin noch Ciclosporin A gegeben werden.

Die Ausscheidung der beiden Lipoxygenaseprodukte LTB_4 und LTC_4 im täglichen Sammelurin der Patienten in der Akutphase nach Nierentransplantation lag zwischen 55 und 110 ng LTB_4/Tag bzw. zwischen 35 und 105 ng LTC_4/Tag. Auf eine Beziehung zum Serumkreatinin wurde hier verzichtet, weil die angegebenen Duchschnittswerte der Leukotriene durch die erhöhten Retentionswerte unmittelbar nach Transplantation verzerrt dargestellt würden. Die entsprechenden Mittelwerte für die Gesamtgruppe betrugen 84 ng LTB_4 pro Tag bzw. 64 ng LTC_4/Tag. Demnach war die Ausschei-

Tab. 11: Daten zum Verhältnis von LTB_4/LTC_4, zur Zahl der Abstoßungsreaktionen, zur Zahl der stationären Behandlungstage, zum Kreatinin vor und nach Nierentransplantation sowie zur Verbesserung des Kreatininwerts.

Nach dem Verhältnis von LTB_4 zu LTC_4 ließen sich die Patienten wie folgt in 3 Gruppen gliedern:

I) Patienten mit Ratio $x > 2.00$, d.h. Nr. 3 und Nr. 8.

II) Patienten mit Ratio $2{,}00 \geq x \geq 1{,}10$, d.h. Nr. 1, 2, 4, 7, 9, 10 und 11.

III) Patienten mit Ratio $x \leq 1{,}10$, d.h. Nr. 5, 6 und 12.

Patient Nr.	Ratio LTB_4/LTC_4	Rang	Zahl der abstoßungs-reaktionen	Stat. Tage	Kreatinin vor op	Kreatinin nach op	Δ Kreatinin	
3	2,50	1	-	23	7,6	2,5	5,1	
8	2,40	2	-	19	13,5	1,2	12,3	8,7±5.1
7	1,88	3	1	45	9,0	1,7	7,3	
11	1,67	4	-	20	10,8	1,3	9,5	
4	1,60	5	2	37	12,0	1,5	10,5	
10	1,57	6	-	22	11,3	2,6	8,7	8,2±1,7
2	1,35	7	-	33	7,7	2,0	5,7	
9	1,29	8	-	31	10,1	1,1	9,0	
1	1,20	9	2	46	7,9	1,5	6,4	
5	1,02	10	7	78	15,3	2,8	12,5	
6	0,89	11	3	103	9,1	1,6	7,7	10,6±2,7
12	0,85	12	5	56	13,6	1,8	11,8	

Zu I)

n = 2,

keine Abstoßungsreaktionen,

mittlere Verweildauer im Krankenhaus: 21±2,8 Tage,

Kreatinin vor Transplantation: 10,6±4,2 mg/dl,

Kreatinin nach Transplantation: 1,9±0,9 mg/dl, Δ Kreatinin: 8,7±5,1 mg/dl,

Therapie: 1x Azathioprin, 1x Ciclosporin A.

dung beider Substanzen im Urin eindeutig zugunsten von LTB_4 verschoben (mittlerer Quotient: 1,52).

Diese Tatsache zeigte sich auch anhand der Verteilung der einzelnen Patienten innerhalb der Spannweite der Meßergebnisse. So waren bei LTC_4 die beiden untersten Klassen im Histogramm zahlenmäßig am stärksten besetzt, wohingegen sich bei LTB_4 genau umgekehrt über 80% der Patientenergebnisse in den drei oberen Klassen befanden (Abb. 57).

Bei der Betrachtung der Mittelwerte der Leukotrienausscheidung pro Tag bestand kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten, hingegen deutet die Ratio darauf hin, daß bei Frauen die Verschiebung zugunsten von LTB_4 doch eindeutiger ausfiel als es bei alleiniger Bewertung der mittleren Tagesmengen zum Ausdruck kam. Eine stati-

---

Fortsetzung der Erläuterung zu Tab. 11

Zu II)
n = 7,
keine bis maximal zwei Abstoßungsreaktionen,
mittlere Verweildauer im Krankenhaus: 33±10Tage,
Kreatinin vor Transplantation: 9,8±1,7 mg/dl,
Kreatinin nach Transplantation: 1,7±0,5 mg/dl, Δ Kreatinin: 8,2±1,7 mg/dl,
Therapie: 4x Azathioprin, davon 1x Wechsel zu Ciclosporin A,
3x Ciclosporin A.

Zu III)
n = 3,
drei bis sieben Anstoßungsreaktionen,
mittlere Verweildauer im Krankenhaus: 79±24 Tage,
Kreatinin vor Transplantation: 12,7±3,2 mg/dl,
Kreatinin nach Transplantation: 2,1±0,6 mg/dl, Δ Kreatinin: 10,6±2,7 mg/dl,
Therapiebeginn jeweils mit Azathioprin, Erweiterung auf Dreifachmedikation.

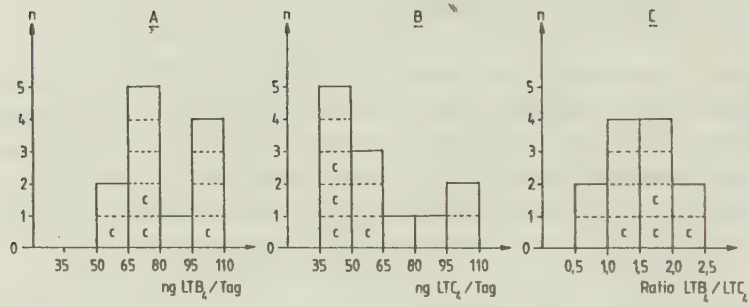


Abb. 57: Verteilung entsprechend der mengenmäßigen Ausscheidung an LTB_4 (A), LTC_4 (B) und LTB_4/LTC_4 (C).
Symbol C innerhalb der Säulen: Initiale Immunsuppression mit Ciclosporin A.

stisch nachweisbare Differenz zwischen den Männern und Frauen hinsichtlich der Quotienten aus LTB_4 und LTC_4 bestand aber nicht (Tab. 12).

Tab. 12: Geschlechtsabhängigkeit der Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin in der Akutphase nach Nierentransplantation.

	$\bar{x}$ LTB_4 (ng/Tag)	$\bar{x}$ LTC_4 (ng/Tag)	$\bar{x}$ Ratio (LTB_4/LTC_4)
♀ (n = 3)	84±13	62±20	1,68±0,71
♂ (n = 9)	84±19	64±24	1,46±0,51

Die Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin in Abhängigkeit von der immunsuppressiven Medikation war unterschiedlich. Die pro Tag meßbaren Mengen beider Stoffe waren unter der Therapie mit Ciclosporin A niedriger als mit Aza-

thioprin, insbesondere bei LTC_4 war die Wirkung deutlich. Aufgrund der großen intraindividuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Patienten einer Gruppe und den niedrigen Fallzahlen (n=8 für Azathioprin, n=4 für CiclosporinA) ließ sich mit statistischen Mitteln nur ein grenzwertiger Nachweis für diesen mutmaßlichen Medikamenteneffekt führen (LTC_4: t=0,88, df=10, $p \leq 0,36$; LTB_4: t=1,77, df=10, $p \leq 0,12$). Andererseits zeigte sich ein Trend in der genannten Richtung im Zusammenhang mit den bereits besprochenen Ergebnissen hinsichtlich der Transplantatabstoßungsreaktionen und den rein deskriptiven Daten des klinischen Verlaufs (Tab. 13).

Tab. 13: Beziehung zwischen der Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin sowie der initialen immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin bzw. mit Ciclosporin A.

	$\bar{x}$ LTB_4 (ng/Tag)	$\bar{x}$ LTC_4 (ng/Tag)	$\bar{x}$ Ratio (LTB_4/LTC_4)
Azathioprin (n=8)	87±19	71±24	1,39±0,54
Ciclosporin A (n=4)	78±14	49± 7	1,77±0,50

Die bereits weiter oben formulierte Hypothese, daß ein Quotient aus LTB_4/LTC_4 der durchschnittlich meßbaren Urinausscheidung von über 1,0 als günstige Voraussetzung für eine gute Transplantatfunktion und eine entsprechende Überlebenszeit des implantierten Organs anzusehen war, wurde gestützt durch die Verhältniswerte für Azathioprin (1,39±0,54) und Ciclosporin A (1,77±0,50). In der Akutphase des postoperativen Geschehens lieferte dieser Quotient offenbar einen wertvollen Hinweis auf die Wirksamkeit der beiden Immunsuppressiva und deren Wirkunter-

schiede. Die Bedingungen für einen statistischen Nachweis der angesprochenen Vermutung waren jedoch nur bedingt gegeben ($t=1,18$, $df=10$, $p \leq 0,26$)

Wurden beide Merkmale (LTB_4 und LTC_4) zusammengefaßt und als gepaarte Stichprobe hinsichtlich Azathioprin und Ciclosporin A miteinander verglichen, dann erwies sich die Kombination als schwächere Unterscheidungskraft ($t=0,82$, $df=10$, $p \leq 0,44$). Demzufolge kam den Meßergebnissen von LTC_4 in der Gruppe der akut nierentransplantierten Patienten eine größere Bedeutung zu als denjenigen von LTB_4.

4.4. Chronische Phase nach Nierentransplantation

4.4.1. Zusammensetzung der Patientengruppe

Zur Charakterisierung der Patienten während der chronischen Phase nach Nierentransplantation wurden ähnliche Daten und Merkmale herangezogen wie in den beiden vorausgehenden Abschnitten. Die Tabelle 14 faßt alle Beobachtungen, die für weitere statistische Auswertungen in Betracht kamen, zusammen.

Tab. 14: Daten zu den Patienten während der chronischen Phase nach Nierentransplantation.

Patient Nr.	Alter (Jahre)	Transplantatalter (Jahre)	Dialysezeit (Jahre)	LTB_4 (ng/Tag)	LTC_4 (ng/Tag)	Ratio LTB_4/LTC_4	Kreatinin (mg/dl)	Ciclosporin A (mg/Tag)	Azathioprin (mg/Tag)	Steroide (mg/Tag)
1	51	8	10	45	46	0,98	3,1	-	75	8,0
2	45	5	7	66	92	0,72	2,1	-	100	7,5
3	42	7	11	42	61	0,69	2,5	-	100	7,5
4	22	5	?	59	63	0,94	3,8	-	100	7,5
5	34	1	4	63	85	0,74	2,3	2,0	-	7,5
6	18	1	?	90	30	0,94	1,7	-	250	10,0
7	50	4	6	48	68	0,71	1,2	-	75	10,0
8	50	8	8	37	60	0,62	0,9	-	25	4,0
9	28	3	10	36	111	0,32	1,1	-	125	5,0
10	35	1	4	82	120	0,68	2,2	2,0	-	7,5
11	44	1	6	112	140	0,80	1,8	2,2	-	5,0
12	50	1	11	105	67	1,57	1,8	2,5	-	5,0
13	47	1	9	141	104	1,36	1,7	2,5	-	5,0
14	39	1(II) 4(I)	6	50	99	0,51	3,1	1,5	-	7,5
15	54	1	4	95	123	0,77	3.1	3,0	-	5,0
16	28	4	?	67	117	0,57	1,2	-	150	4,0
17	44	1	2	131	127	1,03	3,3	-	150	20,0
18	39	3	4	69	149	0,46	1,3	-	150	5,0
19	43	3	4	59	125	0,47	1,3	-	150	5,0
20	62	10	13	146	165	0,88	0,9	-	150	4,0
21	43	1	6	39	63	0,62	2,5	1,5	-	7,5
22	45	4	?	76	58	1,31	1,5	-	150	7,5
23	35	7	10	78	93	0,84	4,5	-	150	8,0
24	48	1(II) 2(I)	?	69	123	0,56	2,2	1,2	-	10,0
25	45	1	9	99	133	0,74	1,5	-	100	10,0
26	38	6	15	46	71	0,65	1,6	2,0	-	15,0
27	56	8	12	67	85	0,79	1,1	-	100	5,0
28	11	2	?	49	89	0,55	3.0	-	100	10,0

Die Sichtung der Datenfülle erfolgt zunächst in Form von Histogrammen und Graphiken. Es ist noch anzumerken, daß nicht alle Patienten vollständig dokumentiert waren. Die vorliegenden Daten vor Transplantation stützen sich auf Briefe oder kurze Aufzeichnungen von auswärtigen Kliniken. Detaillierte Angaben zur Vorgeschichte, zur HLA-Typisierung und zum postoperativen Verlauf der hier besprochenen Patientengruppe waren deshalb jetzt nicht mehr zu erhalten. Zum anderen standen jetzt Kontrollwerte aus der ambulanten Versorgung im Vordergrund, die der Gesamtheit der beiden übrigen Patientenpopulationen gegenüber gestellt werden sollten. Aus diesem Zusammenhang heraus erklärt sich die unterschiedliche Frequenz der Beobachtungen bei den einzelnen Merkmalen, die verglichen wurden.

Das durchschnittliche Lebensalter (Abb. 58) der chronisch nierentransplantierten Patienten betrug 41 Jahre (Kontrollgruppe 37 Jahre). Der Bereich der Altersverteilung von 11 bis 62 Jahren war zwar deutlich weiter als bei den Normalprobanden, doch sind über 80% der Patienten nicht jünger als 25 Jahre und nicht älter als 55 Jahre (entsprechender Altersrahmen der Kontrollgruppe).

Zwei Drittel der Patienten, zu denen Angaben vorlagen (n=20), waren vor der Nierentransplantation zwischen einem und bis zu vier Jahren dialysepflichtig (Abb. 59). Bei zwei Patienten betrug die Wartezeit bis zur Organverpflanzung allerdings 10 Jahre. Als häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz war eine chronische Glomerulonephritis zu nennen.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lag die Nierentransplantation bei einem Drittel der Patienten erst 12 Monate zurück, bei einem weiteren Drittel bis zu 4 Jahre (Abb. 60). Über eine entsprechende Zeitdauer mußten sich diese Patienten vorher im Durchschnitt der chronischen Hämodialyse un-

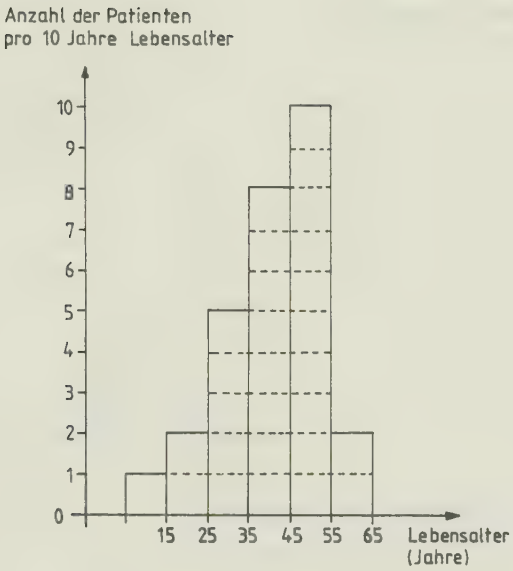


Abb. 58: Altersverteilung der chronisch nierentransplantierten Patienten in 10-Jahres-Intervallen (n=28, $\bar{x} \pm SD$= 41 Jahre±11 1/2 Jahre).

terziehen. Eine längere Transplantatüberlebenszeit hatten nur 9 Patienten zu verzeichnen. Die Mehrheit der funktionsfähigen Transplantate war neueren Datums. Die wenigen Patienten mit langer Transplantatüberlebenszeit zeigten hingegen an, welche Bedeutung die Erkennung und Behandlung von Abstoßungskrisen hat, um die Verlustrate an Nierentransplantaten möglichst klein zu halten. Immerhin waren zwei Patienten schon zum 2. Mal transplantiert worden.

Zur Beurteilung der Transplantatfunktion waren am besten das Serumkreatinin und die glomeruläre Filtrationsrate geeignet. Bei 15 Patienten (54%) lag das Serumkreatinin unter 2 mg/dl und bei weiteren 12 Patienten (43%) zwischen 2 und 4 mg/dl. Nur bei einem Patienten wurden höhere Meßwerte bestimmt (Abb. 61).

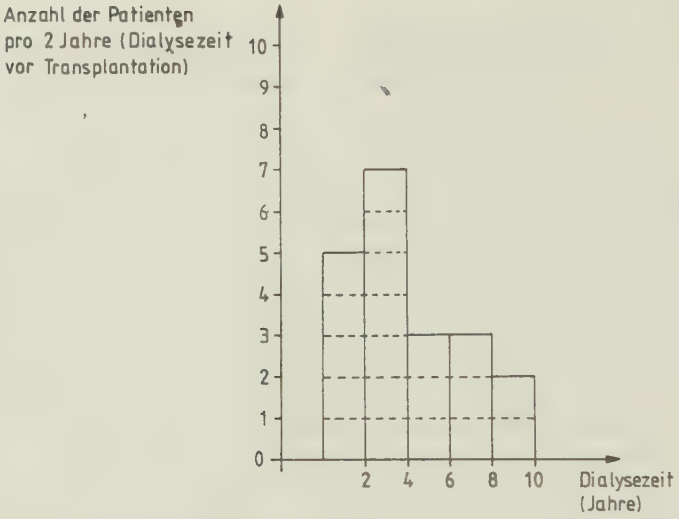


Abb. 59: Zeit der Dialyse vor Nierentransplantation
(n=20, $\bar{x}\pm SD$=4 1/2 Jahre±2 3/4 Jahre).

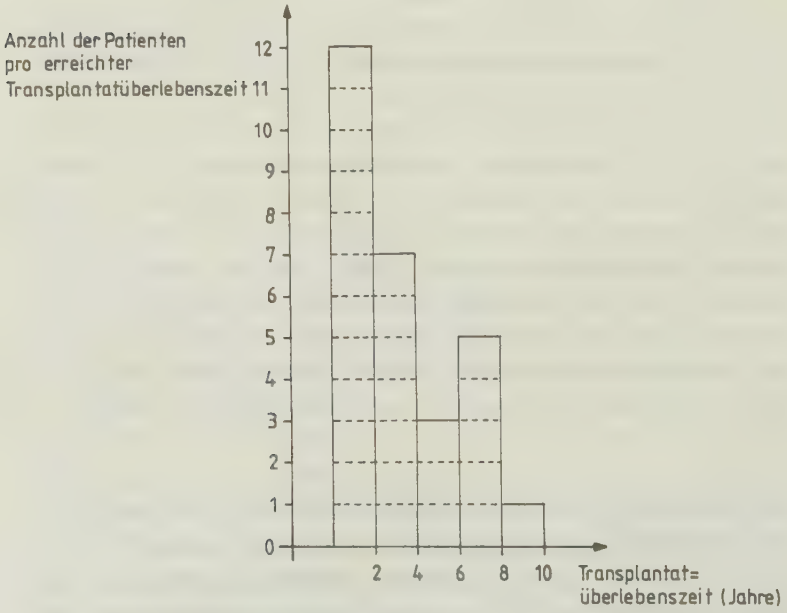


Abb. 60: Transplantatüberlebenszeit
(n=28, $\bar{x}\pm SD$= 3 3/4 Jahre±2 3/4 Jahre).

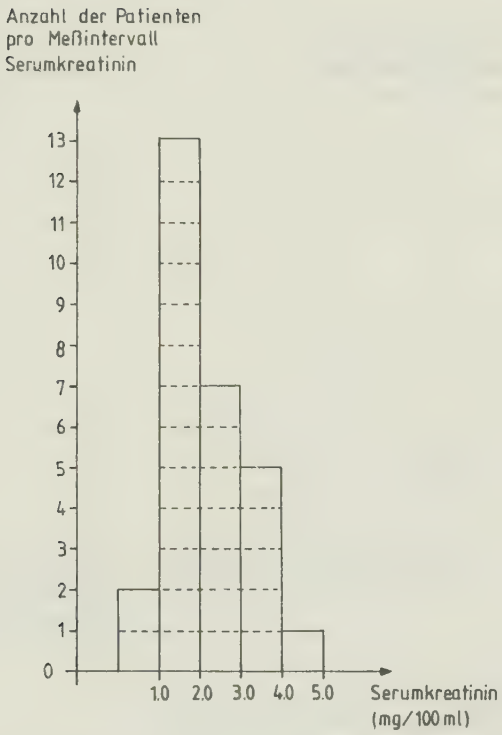


Abb. 61: Verteilung der Serumkreatinin-Meßwerte nach Nierentrans-
transplantation
(n=28, $\bar{x}\pm SD$= 2,0±0,9 mg/dl).

Ein entsprechendes Bild ergab sich aus der Analyse der Serumkreatinin-Clearence. Sie lag bei 50% der Patienten über 60 ml/min. und bei 38% zwischen 30 und 60 ml/min. Nur drei Patienten wiesen eine kritische Kreatinin-Clearence unter 30 ml/min. auf (Abb. 62).

Zusammenfassend bestand bei den meisten Patienten eine chronische Niereninsuffizienz im kompensierten Dauersta-

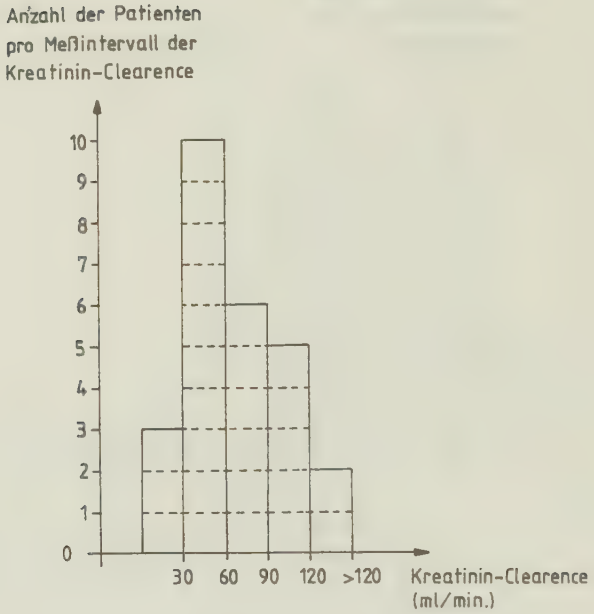


Abb. 62: Meßwerte der Kreatinin-Clearence
(n=26, $\bar{x}\pm SD$= 69±34 ml/min.).

dium (Einschränkung der glomerulären Filtration) oder im Stadium der kompensierten Retention (Kreatinin >1,2 mg/dl, keine klinische Symptomatik).

Erwartungsgemäß waren ansteigende Serum-Kreatininwerte mit einer Abnahme der Kreatinin-Clearence verbunden (Abb. 63). Nur 9 von 26 Patienten erfüllten die Anforderungen der Kategorie kompensiertes Dauerstadium der chronischen Niereninsuffizienz, alle anderen Mitglieder der Gruppe besaßen schlechtere Funktionswerte der Transplantate.

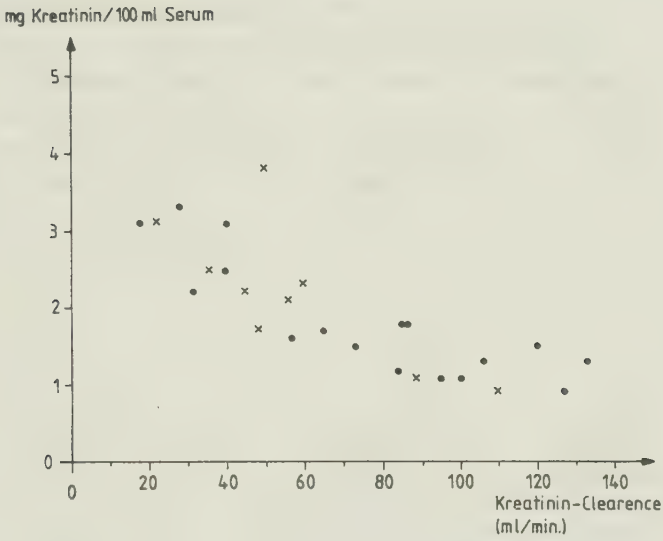


Abb. 63: Serumkreatinin und Kreatinin-Clearence als Maß für die Transplantatfunktion.
(•: ♂, ×: ♀, n=26).

4.4.2. Urinausscheidung von LTB_4 und LTC_4 und ihre Beziehung zu anderen Faktoren

Die tägliche Ausscheidung von LTC_4 lag im wesentlichen zwischen 50 und 150 ng/Tag mit einem Durchschnittswert von 97±32 ng/Tag (n=28). Bei 16 Patienten (≙ 57%) wurden Werte unter 100 ng/Tag bestimmt (Abb. 64). Im gleichen Bereich

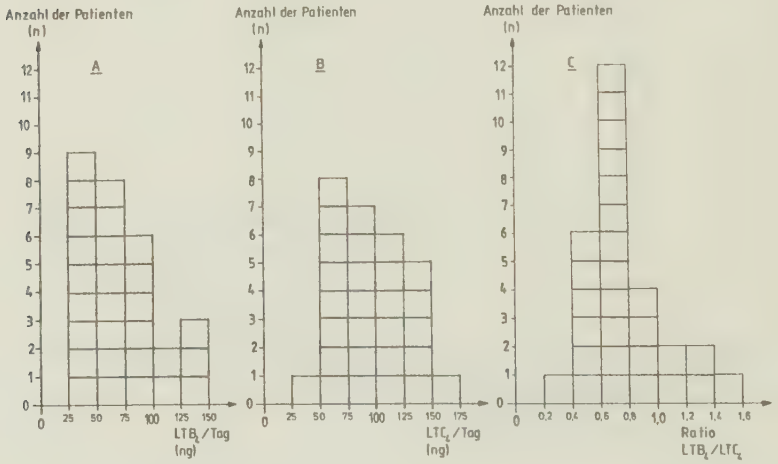


Abb. 64: Verteilung der Ausscheidung pro Tag an LTB_4 (A) und LTC_4 (B) im Urin von Patienten nach Nierentransplantation sowie des Verhältnisses zwischen den beiden Meßwerten der Tagesausscheidung (LTB_4/LTC_4) (C).

bewegte sich die täglich produzierte Menge an LTB_4. Hier fiel jedoch auf, daß 23 Patienten (≙ 82%) Werte unter 100 ng/Tag aufwiesen. Die mittlere Ausscheidung betrug hier 74±31 ng/Tag (n=28). Aus dem Verhältnis beider Metabolite zueinander (LTB_4/LTC_4) errechnete sich ein Mittelwert von 0,79±0,29. Die tägliche Ausscheidung von LTB_4 lag demnach um mehr als 20% unter derjenigen von LTC_4.

Wurden die Daten der täglichen Urinausscheidung von LTB_4

und LTC_4 auf das jeweilige Serumkreatinin bezogen (s. Abschnitt 4.1.3.), so ergab sich der in Abb. 65 dargestellte Eindruck. Fast alle Patienten (93%) wiesen Meßwerte bis

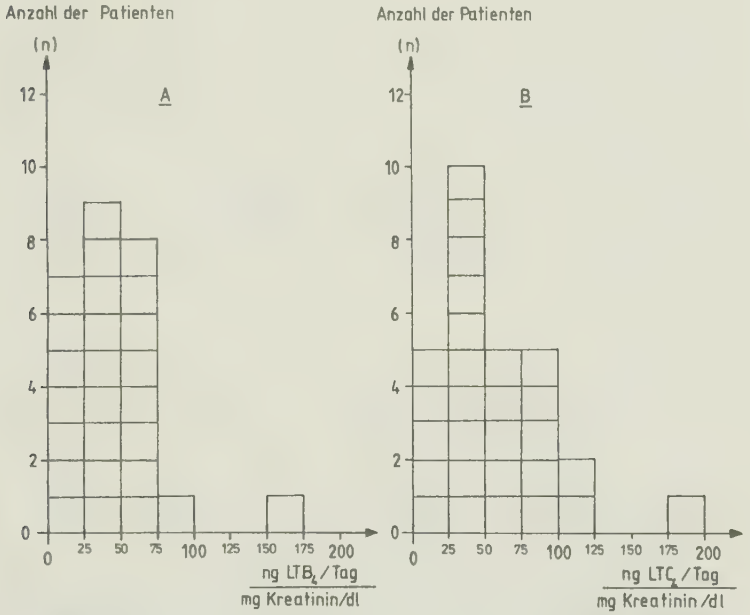


Abb. 65: Tägliche Ausscheidung an LTB_4 (A) und LTC_4 (B) im Urin bezogen auf das Serumkreatinin ($\bar{x}\pm SD$= 43±20 ng LTB_4/Tag/mg Kreatinin pro dl bzw. 58±37 ng LTC_4/Tag/ mg Kreatinin pro dl, n=28).

75 ng LTB_4/Tag/mg Kreatinin pro dl auf. Die Ergebnisse bei 2 Patienten lagen höher. Bei LTC_4 lagen jedoch nur 20 Patienten ($\triangleq$ 71%) unter dieser Marke. Den größten Anteil an der Verteilung hatten zwar bei beiden Substanzen jeweils die Gruppen zwischen 25 und 50 ng/Tag/mg Kreatinin pro dl, doch waren bei LTB_4 die beiden Nachbarklassen eindeutig stärker besetzt. Somit zeigte sich ein Konzentrierungsef-

fekt in Richtung auf eine niedrigere Ausscheidung von LTB_4 im Vergleich zu LTC_4, der das Ergebnis der nicht korrigierten Verhältniswerte beider Substanzen zueinander noch unterstrich.

Andeutungsweise zeichnete sich sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Patienten dieser Gruppe ein Zusammenhang zwischen den täglich im Urin ausgeschiedenen Mengen an LTB_4 und LTC_4 ab. Hohe Meßwerte an LTC_4/Tag waren bei weiblichen (n=10, r=0,42) bzw. bei männlichen Teilnehmern (n=18, r=0,49) mit ebensolchen Ergebnissen an LTB_4/Tag verknüpft. Entstehung und Ausscheidung beider Leukotriene im Urin standen demnach untereinander in Beziehung (Abb. 66).

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeichnete sich bei Patienten in der chronischen Phase nach Nierentransplantation ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Ausscheidung von LTB_4 ($t=2,32$, $df=26$, $p \leq 0,04$) und von LTC_4 ($t=2,52$, $df=26$, $p \leq 0,02$) ab. Dies deutete darauf hin, daß unter langdauernder geringer Immunsuppression Frauen weniger Leukotriene im Urin ausscheiden als Männer. Die Relation zwischen LTB_4 und LTC_4 zeigte keinen Geschlechtsunterschied an (Tab. 14).

Eine Korrelation zwischen dem Lebensalter der chronisch nierentransplantierten Patienten und ihrer Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 ließ sich nicht nachweisen. Hingegen zeigte sich eine Verbindung zwischen der Transplantat-Überlebenszeit (Zeit seit der Organverpflanzung) und der Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin. Bei annähernd gleich hohen Ausgangswerten (ca. 100 mg LTB_4 bzw. LTC_4 pro Tag) für Patienten während des 1. Jahres nach Organtransplantation fiel die mittlere Ausscheidung beider Substanzen bei Patienten, die ihr Organ bereits 8 Jahre besaßen auf die Hälfte (LTB_4) bzw. auf etwa zwei Drittel

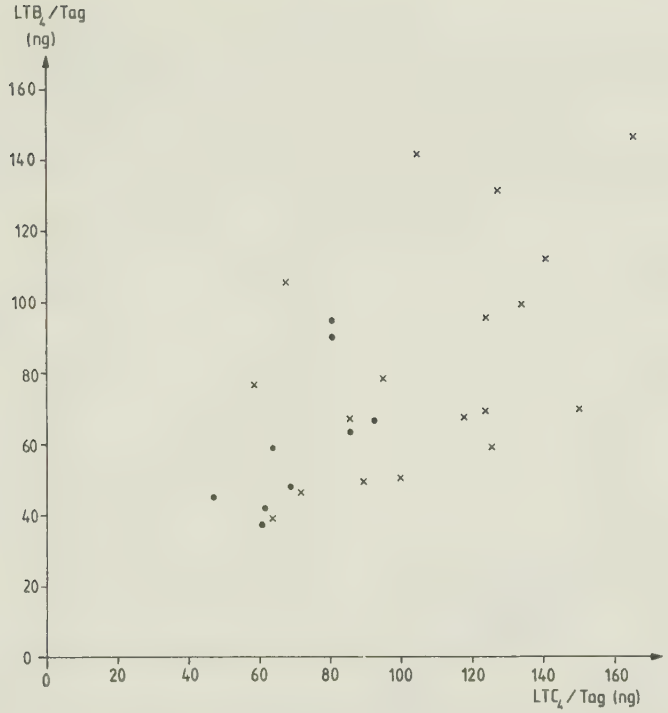


Abb. 66: Korrelation zwischen der täglichen Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 für weibliche (•)(n=10, r=0,42) und männliche Patienten (×)(n=18, r=0,49).

Tab. 14: Mittelwerte der täglichen Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 sowie der Quotient aus beiden Meßwerten für weibliche und männliche Patienten (chronische Phase nach Nierentransplantation).

	$\underline{LTB_4}$ (ng/Tag) $\bar{x}\pm SD$	$\underline{LTC_4}$ (ng/Tag) $\bar{x}\pm SD$	$\underline{Ratio}$ LTB_4/LTC_4 $\bar{x}\pm SD$
♀ (n=10)	57±19	79±24	0,75±0,22
♂ (n=18)	83±32	107±31	0,80±0,32

(LTC_4) der ursprünglichen Menge ab. Im Falle von Leukotrien B_4 geschah dies kontinuierlich, bei Leukotrien C_4 erst nach einen Anstieg auf etwa 135 ng/Tag bei Patienten, deren Transplantation 3 Jahre zurück lag. Ein Patient mit 10-jähriger einwandfreier Organfunktion fügte sich in diesen Verlauf allerdings nicht ein (Abb. 67).

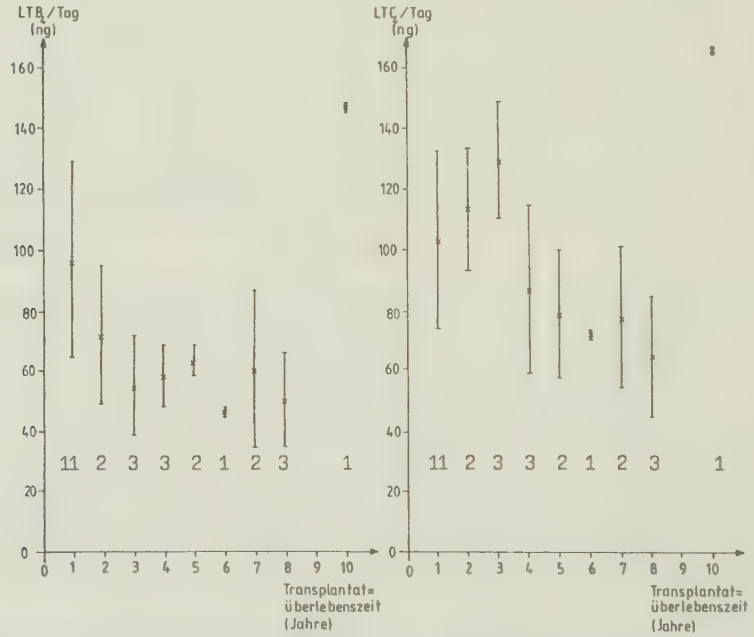


Abb. 67: Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 ($\bar{x}\pm SD$) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Nierentransplantation.

Das Verhältnis der Ausscheidung beider Substanzen zueinander (LTB_4/LTC_4) war anfangs ausgeglichen. Es fiel jedoch bis zum 3. Jahr nach Transplantation auf fast 0,4 zu ungunsten von LTB_4 ab, um nach einigen Schwankungen bis zum Zeitpunkt von 10 Jahren nach Organverpflanzung den Ausgangswert annähernd wieder zu erreichen (Abb. 68). Möglicherweise war dies ein Ausdruck dafür, daß die immuno-

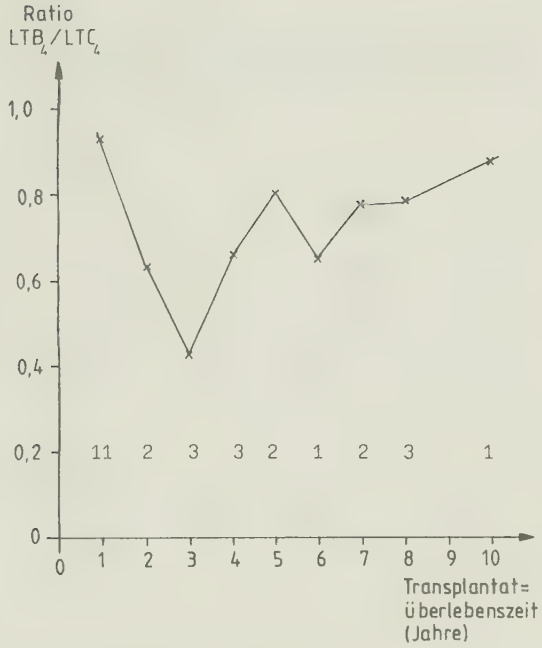


Abb. 68: Entwicklung der relativen Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin während der Zeit nach Nierentransplantation.

logische Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit dem Spenderorgan schrittweise zurückging. Darüber hinaus kam auch die Verminderung der immunsuppressiven und antiphlogistischen Medikation als Ursache für die zahlenmäßige Entwicklung des Quotienten in Frage.

Eine Tendenz in der Ausscheidung von Leukotrien B_4 und C_4, die mit der Dauer der Hämodialyse vor Nierentransplantation in Einklang zu bringen wäre, war nicht zu verzeichnen. Vermutlich hatten Faktoren wie Vorbehandlung und Grunderkrankung des Wirtsorganismus auf die Funktion des implantierten Organs, soweit sie aus den ermittelten Meßwerten an Leukotrien B_4 und C_4 zu ersehen war, eine geringere

Bedeutung als die immunhistologische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger sowie die Abwehrlage des transplantierten Patienten insgesamt (Abb. 69).

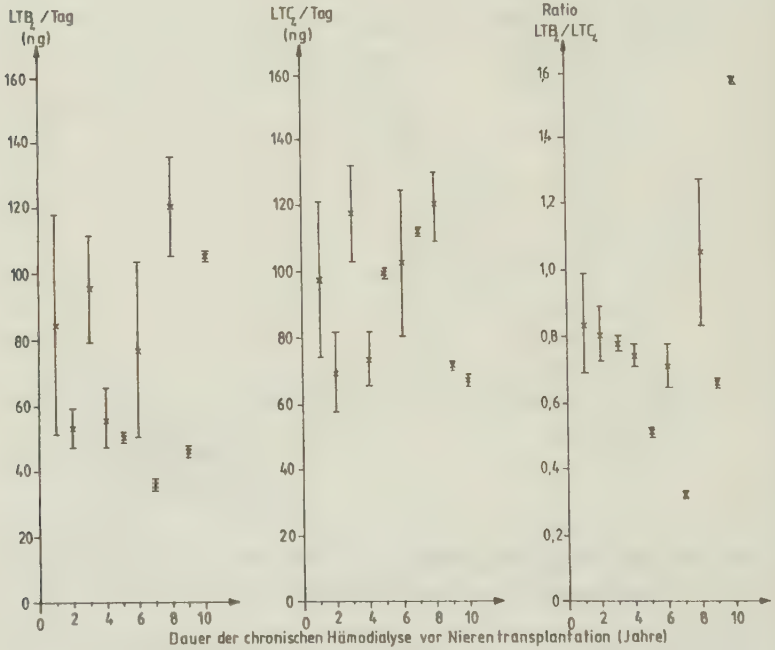


Abb. 69: Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin in Abhängigkeit von der Dauer der chronischen Hämodialyse vor Nierentransplantation ($\bar{x} \pm SD$).

Eine Beziehung zwischen dem Serum-Kreatinin und der Urinausscheidung von LTB_4 bzw. LTC_4 fand sich nicht, allenfalls eine abnehmende Tendenz mit steigenden Kreatininwerten. Das Verhältnis zwischen den beiden Metaboliten war weitgehend unabhängig vom Serumkreatinin. Das gleiche Bild ergab sich bei der Gegenüberstellung des Harnstoff-Stickstoff Gehaltes im Serum und der Leukotrien-Ausscheidung sowie der

Bewertung der glomerulären Filtrationsrate. Als Fazit blieb festzustellen, daß diese Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion nicht mit den Meßwerten der Leukotrien-Ausscheidung im Urin in Einklang zu bringen waren (Abb. 70).

Die eben besprochenen Kriterien der Nierenfunktionsanalyse beschrieben weitgehend die durch vaskuläre Eigenschaften bestimmten Raten der Filtration bzw. der Reabsorption und Retention. Auf diese Parameter konnte LTC_4 Einfluß haben bzw. erhöhte Werte dieser Substanz konnten auf Veränderungen im vaskulären Bereich hindeuten. Welche

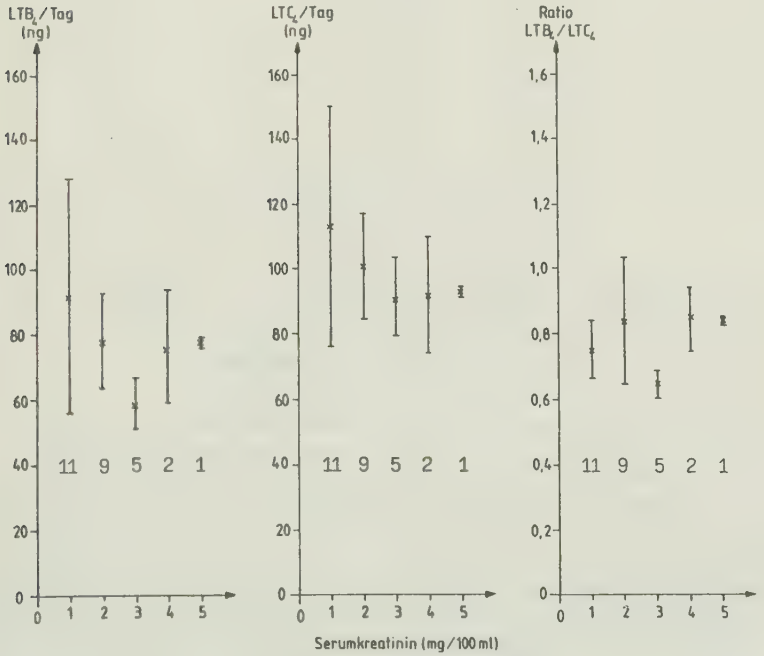


Abb. 70: Beziehung zwischen der Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 im Urin und dem Serumkreatinin ($\bar{x}\pm SD$).

Bedeutung hingegen LTB_4 in Verbindung mit der Akzeptanz des Transplantats und mit der globalen Abwehrlage des Empfängerorganismus zukam, zeigte sich beispielsweise aus der Anzahl der Leukozyten im Blut. Die entsprechenden Labordaten lagen bei allen Patienten während der chronischen Phase nach Nierentransplantation im Normbereich (Abb. 71).

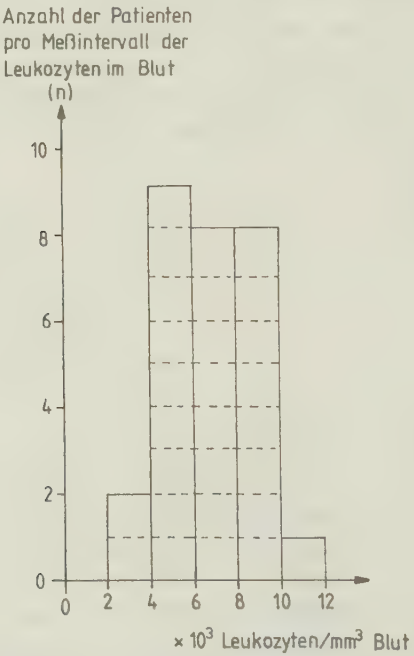


Abb. 71: Verteilung der Patienten entsprechend der Leukozytenwerte im Blut (n=28, $\bar{x}\pm SD$= 6800±1800 Leukozyten/mm^3).

Die immunologische Situation war also weder geschwächt noch lagen Zeichen einer akuten Infektion oder einer Abstoßungsreaktion vor. Dementsprechend war auch die Verteilung der Ausscheidung an Leukotrien B_4. Es ergab sich kein Anhalt für eine erhöhte Lipoxygenaseaktivität mit erhöhter Leukozytenzahl. Folglich bestand nach diesen Ergebnissen keine

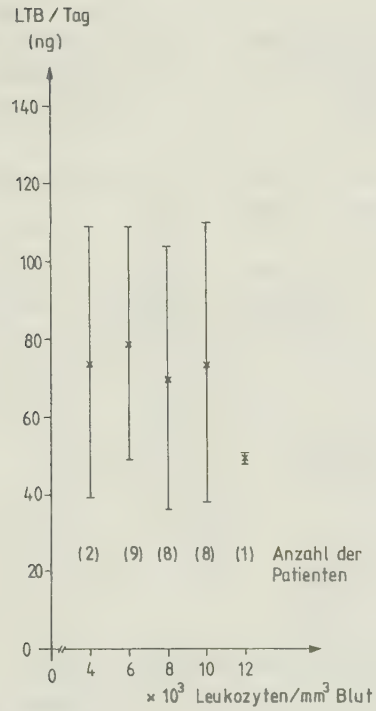


Abb. 72: Korrelation zwischen der Ausscheidung an LTB_4 im Urin von chronisch nierentransplantierten Patienten und der Zahl der Leukozyten/mm^3 Blut ($\bar{x} \pm SD$).

Möglichkeit, die zelluläre Aktivität über die Menge des ausgeschiedenen LTB_4 abzuschätzen (Abb. 72).

Schließlich ist die Frage zu beantworten, inwieweit die Medikation mit Azathioprin bzw. Ciclosporin A und mit Steroiden einen Einfluß auf die Urinausscheidung der beiden Metabolite der Arachidonsäure ausübte. Unter der Behandlung mit Ciclosporin A (n=10) war die Ausscheidung von LTB_4 gegenüber LTC_4 erniedrigt (Quotient LTB_4/LTC_4 = 0,83). Deutlicher kam dies noch bei den Patienten (n=18) zum Ausdruck,

die Azathioprin erhielten (Quotient LTB_4/LTC_4 = 0,76). Im Gegensatz zu dem Ergebnis im vorausgehenden Abschnitt deutete sich hier ein Effekt der unterschiedlichen Medikation und Beeinflussung des Immunsystems an (Tab. 15).

Tab. 15: Beziehung zwischen immunsuppressiver Medikation und Urinausscheidung an LTB_4 und LTC_4.

Medikament	Zahl der Patienten	LTB_4 (ng/Tag) $\bar{x}\pm SD$	LTC_4 (ng/Tag) $\bar{x}\pm SD$	Ratio LTB_4/LTC_4 $\bar{x}\pm SD$
Ciclosporin A	n=10	80±33	99±27	0,83±0,35
Azathioprin	n=18	71±31	95±35	0,76±0,25

Nach statistischer Auswertung zeigte sich aber, daß die angesprochene Medikamentenwirkung in Bezug auf den Quotienten aus LTB_4 zu LTC_4 nur ansatzweise zu belegen war ($t=0,65$, $df=26$, $p\leq 0,52$). Ein ähnlicher Trend deutete sich bei der Analyse der Ausscheidung von LTB_4 bzw. von LTC_4 bezogen auf Ciclosporin A und Azathioprin an. Mit rechnerischen Mitteln ließ sich jedoch auch in diesem Fall kein Anhalt zur Bestätigung dieser Hypothese finden (LTB_4: $t=0,77$, $df=26$, $p\leq 0,45$; LTC_4: $t=0,30$, $df=26$, $p\leq 0,76$).

Aufschlußreich war ein Vergleich zwischen der Menge an verordneten Steroiden und der Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 im Urin. Wegen der kleinen Fallzahlen wurde eine Unterteilung in Kategorien mit weniger als 5 mg Steroiden/Tag bzw. mit mehr als 5 mg Steroiden/Tag getroffen. Zusätzlich wurde zwischen Ciclosporin A und Azathioprin als zusätzliche immunsuppressive Medikation unterschieden (Abb. 73).

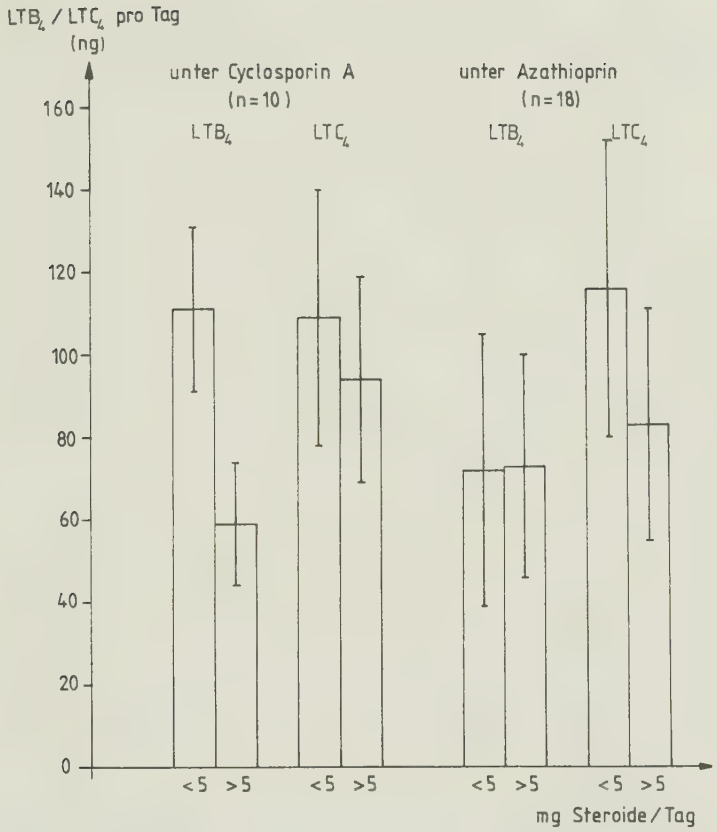


Abb. 73: Ausscheidung an LTB_4 bzw. LTC_4 pro Tag in Abhängigkeit von der täglichen Steroid-Dosis (weniger bzw. mehr als 5 mg/Tag) und aufgeschlüsselt nach Immunsuppression mit Ciclosporin A bzw. Azathioprin ($\bar{x}\pm SD$).

Für beide Leukotriene wurde deutlich, daß bei niedriger Dosierung des Steroids (<5mg/Tag) die Ausscheidung an LTB_4 und LTC_4 im Urin größer war (86±35 ng LTB_4/Tag bzw. 113±33 ng LTC_4/Tag) als bei hoher Dosierung (>5mg/Tag). Dann wurde im Urin 67±24 ng LTB_4/Tag bzw. 87±27 ng LTC_4/Tag gemessen.

Die Abhängigkeit von der verabreichten Menge an Glucocorticoiden ließ sich auch statistisch absichern (LTB_4: t=1,76, df=26, $p \leq 0,07$; LTC_4: t=2,37, df=26, $p \leq 0,035$).

Wurde als zusätzlicher Faktor noch die Medikation mit Ciclosporin A bzw. mit Azathioprin berücksichtigt, dann bestand für LTB_4 bei den Patienten, die Ciclosporin A erhielten, eine deutliche Differenz zwischen niedriger und hoher Steroid-Dosierung (113±20 ng LTB_4/Tag gegenüber 58±16 ng LTC_4/Tag, was sich auch statistisch belegen ließ (t=4,86, df=8, $p \leq 0,0015$). Ein ähnlich klarer Unterschied in Abhängigkeit von der Steroidgabe bestand hinsichtlich der LTC_4-Ausscheidung bei Patienten, die zusätzlich Azathioprin erhielten (116±36 ng LTC_4/Tag gegenüber 83±28 ng LTC_4/Tag). Die statistischen Daten lauteten: t=2,21, df=16, $p \leq 0,045$.

Die verabreichte Menge an Glucocorticoiden hatte auf die Urinausscheidung von LTC_4 bei Patienten mit Immunsuppression durch Ciclosporin A allenfalls einen grenzwertigen Einfluß (109±31 ng LTC_4/Tag gegenüber 94±25 ng LTC_4/Tag; t=0,84, df=8, $p \leq 0,42$). Die Ausscheidung von LTB_4 bei Patienten, die Azathioprin erhielten, war unabhängig von der Steroid-Dosis.

Wurde die Einteilung der Meßergebnisse anhand der Kategorien Ciclosporin A bzw. Azathioprin vorgenommen, dann lag die Urinausscheidung beider Leukotriene bei Ciclosporin A geringfügig höher als bei Azathioprin (80±33 ng LTB_4/Tag gegenüber 71±29 ng LTB_4/Tag bzw. 100±27 ng LTC_4/Tag gegenüber 96±35 ng LTC_4/Tag). Statistisch absicherbare Differenzen bestanden aber nicht. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Addition beider Leukotriene getrennt nach Ciclosporin A und Azathioprin gefunden.

Abschließend ist noch anzufügen, daß die hier eingesetzten Steroid-Dosen deutlich unter denen während der akuten

Phase nach Nierentransplantation lagen (bis zu 250 mg i.v. pro Tag). Demzufolge müßte es möglich sein, den Effekt des Einsatzes dieser Medikamente im Verlauf einer Abstoßungsreaktion anhand der Urinausscheidung der Leukotriene zu verfolgen.

4.5. Vergleich zwischen gesunden Probanden und Patienten während der akuten bzw. der chronischen Phase nach Nierentransplantation

Die Zahl der Teilnehmer pro Gruppe und ihre Verteilung auf das männliche und weibliche Geschlecht waren etwas unterschiedlich. In der Gruppe der gesunden Freiwilligen befanden sich 5 Frauen und 5 Männer. Bei den akut nierentransplantierten Patienten betrug der Anteil der Frauen jedoch nur 25%, bei der letzten Gruppe immerhin noch etwas mehr als ein Drittel. Der Altersbereich hingegen war sowohl bei den gesunden Normalprobanden als auch bei den nierentransplantierten Patienten vergleichbar. Hinsichtlich der chronischen Hämodialysedauer stimmten die Patienten, die mit größerem zeitlichen Abstand nach Nierentransplantation untersucht wurden, mit den Akutpatienten überein. Die interindividuellen Unterschiede in beiden Gruppen waren allerdings beträchtlich.

Im Vergleich zu den Kreatininwerten bei gesunden Freiwilligen (Normalwerte) lagen die Daten der Patienten während der akuten und der chronischen Phase nach Nierentransplantation im Bereich der kompensierten Retention. Vereinzelt wurden im Anschluß an die Organverpflanzung sogar Kreatininwerte erreicht bzw. gehalten, die im Normbereich lagen. Andererseits gab es auch weniger günstige Verläufe.

Die Urinausscheidung von LTB_4 wies bei der Gruppe der gesunden Freiwilligen mit Abstand die höchsten Werte auf. Mit ca. 180 ng/Tag fanden sich hier mehr als doppelt so hohe Werte wie bei nierentransplantierten Patienten in der Früh- und Spätphase. LTC_4 hingegen wurde im gleichen Verhältnis weniger ausgeschieden, d.h. etwa 1/3 - 1/4 der Mengen, die sich im Urin der Gruppen 2 und 3 pro Untersuchungstag nachweisen ließen (siehe Tab. 16). Dementspre-

Tab. 16: Zusammenfassung I) Gesunde Freiwillige,
II) Patienten akut nach Nierentransplantation,
III) Patienten chronisch nach Nierentransplantation.

	Teilnehmer (n)	Alter (Jahre)	Dialysedauer (Jahre)	Kreatinin (Endwert) (mg/dl)	LTB_4 (ng/Tag)	LTC_4 (ng/Tag)	Ratio LTB_4/LTC_4
I) Frauen	5	47± 6	-	1,0±0,2	180±66	27±13	12±12
Männer	5	27± 3	-	1,0±0,2	183±55	30± 8	7,2±3,8
Gesamt	10	37±11	-	1,0±0,2	181±56	28±14	9,5±10,2
II) Frauen	3	32±16	4±1	2,0±0,5	84±13	62±20	1,68±0,71
Männer	9	46±10	5±4	1,7±0,6	84±19	64±24	1,46±0,51
Gesamt	12	43±13	4±3	1,8±0,6	84±18	64±22	1,52±0,54
III) Frauen	10	38±12	3±1	2,1±0,9	59±17	79±24	0,73±0,19
Männer	18	43±11	6±3	2,1±1,0	83±32	107±31	0,80±0,32
Gesamt	28	41±12	5±3	2,0±0,9	74±30	97±32	0,78±0,28

chend errechnete sich ein zahlenmäßiges Übergewicht von LTB_4 zu LTC_4 von fast 10:1! Unmittelbar nach Nierentransplantation wurde im Mittel zunächst noch mehr LTB_4 ausgeschieden als LTC_4, jedoch war der Quotient mit 1,5:1 hier deutlich kleiner als bei der vorausgehenden Gruppe. Wurde der zeitliche Abstand zur Organverpflanzung größer, dann verschob sich das Verhältnis weiter zugungsten von LTC_4, wie das Ergebnis der Gruppe III zeigte. Die im Mittel nachweisbare Menge an LTB_4 im Urin war zwar weitgehend unverändert, die Ausscheidung an LTC_4 hatte jedoch zugenommen. Das Verhältnis beider Substanzen für die Gesamtheit der Gruppe III betrug weniger als 1,0.

5. Messungen der Lipoxygenaseaktivität in Biopsieproben

5.1. Zusammensetzung der Patientengruppe

An der nachfolgenden Studie zur Untersuchung der Lipoxygenaseaktivität in Biopsieproben aus Colonmukosa waren zwölf männliche Patienten im Alter zwischen 26 und 60 Jahren beteiligt. Die Diagnosen, die Lokalisierung des Entzündungsgeschehens und der Aktivitätsgrad der Erkrankung sind in Tab. 17 zu finden. Weiterhin ist hier die Art der antiphlogistischen Therapie verzeichnet.

Tab 17: Daten der Patienten, von denen Biopsien aus gesunder und entzündeter Colonmukosa gewonnen wurden.

Patient Nr.	Alter (Jahre)	Diagnose	Lokalisation	Aktivitäts-grad	Therapie
1	26	M. Crohn	Sigma, -	-	-
2	40	Colitis ulcerosa	" , Rectum	III	5-AS
3	54	Proctitis	" , "	IV	Steroide
4	55	Colitis ulcerosa	" , "	IV	5 AS bzw. SA
5	53	"	" , "	III	5-AS
6	50	"	" , "	III	"
7	68	"	" , "	IV	"
8	47	"	" , "	III	5-AS, Steroide
9	59	"	" , "	IV	-
10	68	"	" , "	III-IV	5-AS
11	26	"	" , -	IV	-
12	48	M. Crohn	" , -	-	5-AS

5.2. Charakterisierung der Lipoxygenaseaktivität

Mit Hilfe der bei der HPLC-Auftrennung gewonnenen radioaktiven Peaks konnten die relativen Umbauraten der Arachidonsäure zu den verschiedenen Lipoxygenaseprodukten gemessen werden (siehe Abschnitt 2.7.2.). Insgesamt gesehen wurden im Durchschnitt um 4,6% (Bereich 0,5 bis 15%) des angebotenen Substrats durch die Lipoxygenase umgesetzt. Da nur für LTB_4 und LTC_4 spezifische Antikörper zur Verfügung standen (siehe Abschnitt 2.2.1.), wurden die beiden Metabolite mittels Radioimmunoassay in den extrahierten Inkubationsansätzen ohne markierte Arachidonsäure gemessen und die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Wiederauffindungsraten auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen. Die Methodik der Radioimmunoassays wurde entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.9. abgeändert.

Für 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE stand nur die HPLC-Analytik zur Verfügung. Aufgrund der bekannten eingesetzten Menge an ^{14}C-markierter und an unmarkierter Arachidonsäure war es aber möglich, die relative Umbaurate dieser drei Metabolite im Stoffwechselspektrum der Lipoxygenaseaktivität unter Bezug auf den Proteingehalt der Probe in Absolutwerte zu übertragen.

5.3. Lipoxygenaseaktivität in gesunder und in entzündeter Colonmukosa

Die in vitro-Versuche mit Arachidonsäure und Colonmukosa zeigten, daß das lösliche Enzym Lipoxygenase auch im 100 000 g Überstand von homogenisierten menschlichen Biopsieproben nachweisbar war. Aufgrund der sehr geringen Menge an zur Verfügung stehendem biologischem Ausgangsmaterial (Gesamtprotein je Patient zwischen 0,14 und 1,95 mg) ließen sich bei jedem Patient nur jeweils 2 Inkubationsansätze durchführen. Die Auftrennung der markierten Lipoxygenaseprodukte mittels HPLC gestattete dabei die Beschreibung eines relativen Metabolitenspektrums, wobei in interindividuell schwankenden Prozentsätzen LTB_4, LTC_4, 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE identifiziert werden konnten. Bei dem intraindividuellen Vergleich gesundes/entzündetes Gewebe war bei den Leukotrienen kein einheitlicher Trend erkennbar (Abb. 74).

Auch insgesamt gesehen unterschieden sich gesundes und entzündetes Gewebe nicht wesentlich voneinander. Bei Betrachtung der Absolutwerte wurden in entzündeter Colonmukosa sogar weniger LTB_4 und LTC_4 gefunden als in Biopsieproben aus gesunder Colonmukosa (Tab. 18).

Bei den drei HETE-Metaboliten fiel jedoch auf, daß diese in allen Fällen zu größeren relativen Anteilen von entzündlicher Colonmukosa gebildet wurden (Abb. 75). Anhand des Student-t-Tests für verbundene Stichproben ergab sich für die Summe der relativen Metabolismusraten der mono-HETE´s eine signifikante Differenz zwischen gesunden und entzündeten Biopsieproben ($p = 0{,}024$).

Die quantitative Erfassung der beiden Leukotriene mit Hilfe spezifischer RIA-Methoden im Anschluß an die Extraktion des unmarkierten Inkubationsgemisches ergab deutlich

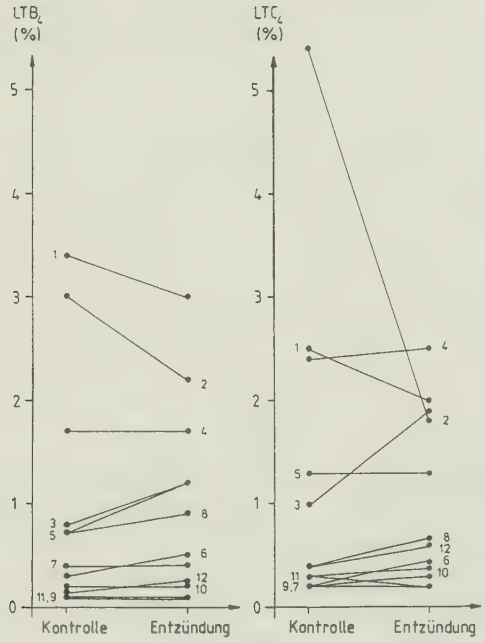


Abb. 74: Relative Metabolisierungsraten (%) nach HPLC-Auftrennung für LTB_4 und LTC_4 durch Inkubation von Lipoxygenase aus menschlicher Colonmukosa mit ^{14}C-markierter und unmarkierter Arachidonsäure.

höhere Konzentrationen an LTC_4 als an LTB_4 (Tab. 19).

Die radioimmunologisch erzielten Ergebnisse für beide Leukotriene lagen außerdem um ein bis zwei Zehnerpotenzen über den chromatographisch ermittelten Daten (vgl. Tabellen 18 und 19). Es konnten jedoch ähnlich wie bei den HPLC-Messungen keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Werten aus entzündeten und gesunden Gewebeproben beobachtet wer-

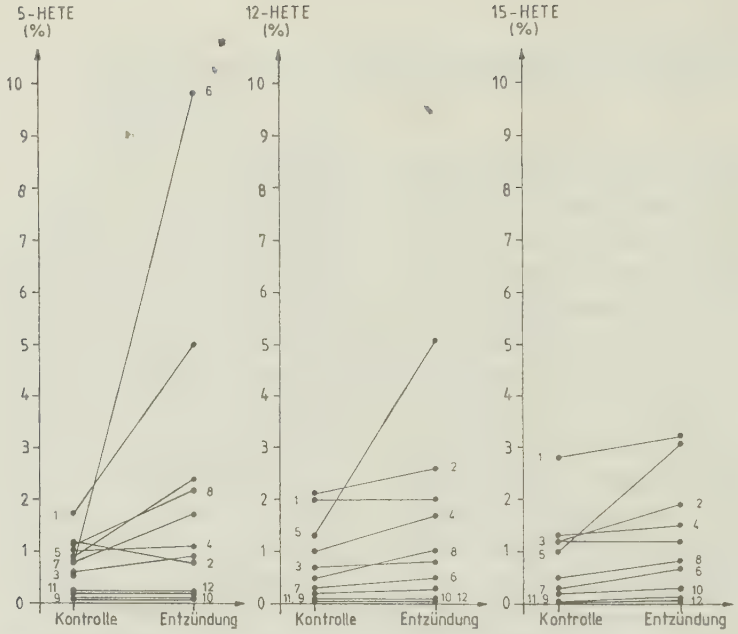


Abb. 75: Relative Metabolisierungsraten nach HPLC-Auftrennung für 5-HETE, 12-HETE und 15-HETE durch Inkubation von Lipoxygenase aus menschlicher Colonmukosa mit ^{14}C-markierter und unmarkierter Arachidonsäure.

Tab. 18: Zusammenstellung der Daten zur Prüfung der Lipoxygenaseaktivität in Biopsieproben aus gesunder und entzündeter Colonmukosa. Relative Metabolisierungsraten (%) und entsprechende Absolutwerte (pg Metabolit/µg Protein/10 min.) von LTB_4, LTC_4, 15-HETE, 12-HETE und 5-HETE nach HPLC-Auftrennung (n=12, $\bar{x}\pm SD$).

Kontrolle	LTB_4	LTC_4	Σ LT's	15-HETE	12-HETE	5-HETE	Σ HETE's
%	0,96±1,14	1,22±1,56	2.18	0,73±0,82	0,70±0,74	0,68±0,50	2,11
pg	140	330	470	101	97	94	292
Entzündung							
%	0,98±0,93	1,01±0,84	1,99	1.09±1,14	1,19±1;50	2,03±2,82	4,31
pg	118	226	344	125	136	232	493

den. Auch hier fielen wie bei den vorausgehend besprochenen Untersuchungen die großen interindividuellen Schwankungen der Meßergebnisse auf (Abb. 76).

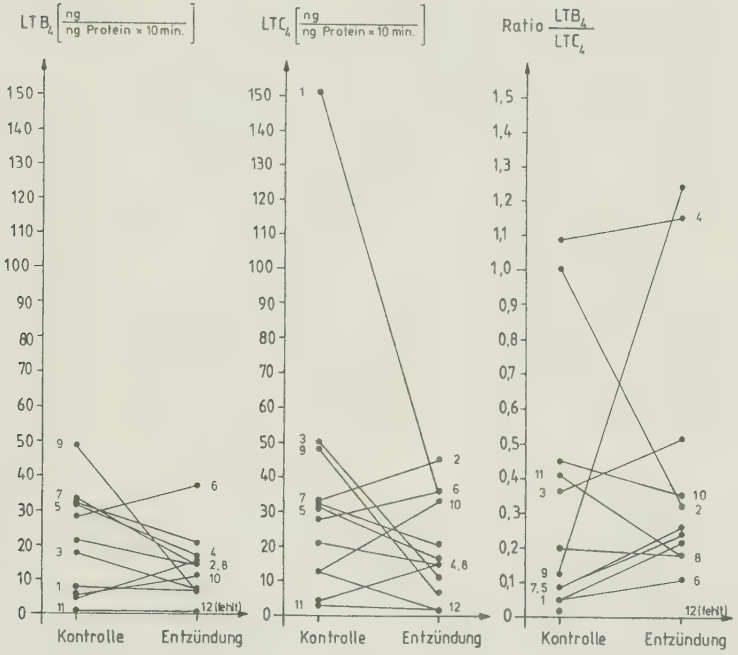


Abb. 76: Radioimmunologisch bestimmte Umsatzraten für LTB_4 und LTC_4 nach HPLC-Auftrennung von Inkubationsansätzen mit Lipoxygenase aus Biopsieproben menschlicher Colonmukosa und unmarkierter Arachidonsäure.

Tab. 19: Zusammenstellung aller Daten zur Messung der Lipoxygenaseaktivität und spezifischen RIA-Methoden. Umsatzraten für LTB_4 und LTC_4 nach HPLC-Auftrennung (ng Metabolit/µg Protein/10 min.; n=12, $\bar{x}\pm SD$).

	LTB_4	LTC_4	LTB_4/LTC_4
Kontrolle	7,4±9,3	35,7±39,6	0,3±0,4
Entzündung	7,6±5,3	19,9±14,2	0,4±0,4

6. Diskussion

6.1. Kombiniertes Extraktionsverfahren für Leukotriene

Das Spektrum der aus Arachidonsäure entstehenden Lipoxygenase-Produkte hat zunehmend Interesse gefunden. Nach der Entdeckung und der näheren chemischen Charakterisierung dieser Substanzklasse stehen die Untersuchungen zur pathophysiologischen Bedeutung einer Vielzahl von Metaboliten dieses Stoffwechselweges aber noch am Anfang (193 - 202). Trotzdem ist die Sammlung von Fakten und Erkenntnissen über die im Organismus vorliegenden Mengen an Lipoxynoiden (Basiswerte, pathologische Daten), über die Art und den Umfang des Metabolismus, über stabile Endprodukte in Körperflüssigkeiten und Geweben und über die pharmakologische Beeinflußbarkeit der Leukotriene und ihrer Vorstufen rasch im Anwachsen begriffen (203 - 217). Zusätzlich wurde vor kurzem über weitere, neu entdeckte Substanzen (Lipoxine, Trihydroxytetraene) aus dem Lipoxygenase-Stoffwechsel berichtet (218, 219).

Die biologische Dynamik und Potenz der Prostaglandine und der Leukotriene wird beispielsweise dadurch deutlich, daß die intravenöse Gabe von Arachidonsäure bei Versuchstieren innerhalb von wenigen Minuten den Tod zur Folge hatte (248). Dabei fanden sich nach lichtmikroskopischer Untersuchung speziell an der Niere Fibrinniederschläge in den Glomeruli und im Interstitium. Elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch wurden eine Schwellung von Endothelzellen der Glomeruli mit daran nicht-komplexiv gebundenem Immunglobulin G nachgewiesen. Die beschriebenen vasculären und immunologischen Reaktionen waren mit den bislang bekannten Eigenschaften der Eicosanoide zu erklären (237 , 238, 286 - 288). Die Lipooxygenase-abhängigen Metabolite der Arachidonsäure sind an diesem foudroyanten toxischen Geschehen wie auch an Entzündungs- und Abwehrvorgängen in beträchtlichem Umfang beteiligt (239 - 247).

Um die Rolle von LTB_4 und LTC_4 im Gefolge von Nierentransplantationen und während einer Abstoßungsreaktion, wo im Sinne einer exsudativen Entzündung ähnliche Schäden auftreten wie im oben beschriebenen Tierexperiment, genauer zu untersuchen, wurde eine spezielle Analytik für Urinproben entwickelt. Voraussetzung für den exakten Nachweis der Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 bei nierengesunden Probanden und nierentransplantierten Patienten waren neben möglichst geringen Verlustraten während des Aufarbeitungsprozesses die Beseitigung von interferierenden Proteinen sowie die effektive Abtrennung von Pigmenten und von Salzen. Ferner war die chemische und biochemische Instabilität der Leukotriene während der Lagerung und während der Probenextraktion zu beachten.

Direktmessungen von Leukotrienen in biologischen Proben mit spezifischen Radioimmunoassays ohne spezielle vorausgehende Aufreinigung wurden bisher nur in einzelnen Fällen beschrieben (107, 115, 139, 151 - 154). In der Regel wurden entsprechende Bestimmungen in definierten Substraten wie Überstände von Inkubationsansätzen aus Zellpräparationen oder nach eingehender Extraktion biologischen Materials durchgeführt (108, 109, 133, 146, 150).

Die mit der Aufreinigung von Prostanoiden aus biologischem Material gewonnenen Erfahrungen ließen sich nur bedingt auf die entsprechende Darstellung von Lipoxygenase-Produkten, insbesondere von cysteinhaltigen Leukotrienen übertragen (90, 113, 115, 128, 131, 138, 140, 156, 157, 165). Deshalb sollte eine Ansäuerung von Proben, z.B. in Hinsicht auf eine angestrebte Zwei-Phasen-Flüssig-Extraktion, vermieden werden (90, 142, 161, 162). Auch die alleinige Sedimentation bzw. eine Kryokonservierung in wäßriger Form erwies sich als unzureichend (88, 108, 109, 155). Die Fällung der Urinproben unmittelbar nach ihrer Gewinnung mit einem Überschuß an eiskaltem abso-

lutem Äthanol gewährleistete hingegen eine vollständige Präzipitation von Proteinen und Zellen. Dadurch wurden mögliche weitere enzymatische Abbauvorgänge definitiv blockiert (88, 107, 109, 133, 139, 157).

Aufgrund eigener gaschromatographisch-massenspektrometrischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in äthanolischer Lösung bei -20 °C in Urinproben, die mit authentischem LTB_4 versetzt waren, langfristig keine Umlagerung auftrat. LTC_4 wurde nach Ergebnissen mit der HPLC innerhalb von acht Monaten zu jeweils 5% in 11-trans-LTC_4 bzw. in das LTC_4-Sulfoxid umgelagert. Enzymatische Umwandlungen fanden hingegen nicht statt. Die Verluste bei diesem ersten Schritt der Probenaufarbeitung betrugen für LTB_4 5±3% und für LTC_4 9±5 % ($\bar{x}$±SD, n=24) und befanden sich in guter Übereinstimmung mit der Literatur (107, 109, 131, 139, 160, 163, 164).

Andere Untersucher, deren Protokoll diesen vorbereitenden Schritt zur Inaktivierung der Metabolisierungsfähigkeit der biologischen Probenmatrix nicht enthielt, fanden dementsprechend Recoveries von 3% des Ausgangsmaterials (107 - 109, 113, 133). In Puffern oder in Perfusionsmedien betrug der Verlust nur ca. 10% und war offenbar auf eine chemische Degradation wie oben beschrieben zurück zu führen. Übertragen auf die Lagerung von Reinsubstanzen hatte der Zusatz von Methanol oder Äthanol zur wäßrigen Phase oder die Verwendung von Laufmittel aus der HPLC bei neutralem pH-Wert einen konservierenden und stabilisierenden Effekt (90, 95, 142).

Die Extraktion von LTB_4 und LTC_4 aus Urin war durch Trennung zwischen zwei flüssigen Phasen oder durch Säulenchromatographie an underivatisierten Silica-Materialien nich durchführbar (90, 113, 115, 128, 131, 138, 140, 156, 157, 165). Für diese spezielle Anwendung waren Silica mit Octadecylsilyl-Gruppen an der Oberfläche als Festphase und ge-

pufferte Methanol-Wasser-Gemische als mobile Phase besser geeignet (108, 111, 112, 129, 131, 155, 158). Durch standardisiertes Material in Form von Einmal-Trennsäulen (nachsilaniserte, sphärische Partikel) wurden in der Vorreinigung von Proben Trennergebnisse von der Qualität einer Reverse Phase-Chromatographie erzielt (88, 110, 129, 160).

Das Retentionsverhalten der Probensubstanzen ließ sich durch Variation des organischen Laufmittelanteils, durch Änderung des pH-Werts und durch Zusatz eines Gegenions derart steuern, daß Urinfarbstoffe weitgehend entfernt werden konnten. Nach Art eines Gradientensystems konnten LTB_4 und LTC_4 innerhalb eines "Fensters" mit einem kleinen Laufmittelvolumen selektiv entfernt werden. Aufbauend auf bereits bekannten Ergebnissen (88, 108, 111, 112, 129, 131, 163) erfolgte die Abtrennung von Substanzen, die polarer als LTB_4 und LTC_4 waren, bei einem Methanol-Gehalt von 65%, einem pH von 5,0 und bei einer Konzentration des Gegenions Butylamin von 1 mM (maximale Retention). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen eluotropen Eigenschaften von LTB_4 und LTC_4 wurde dann eine Umkonditionierung auf 85% Methanol und einen pH-Wert von 8,0 vorgenommen (maximale Elution).

Dieses stufenweise Extraktionsverfahren war für sphärisches, nachsilanisiertes ODS-Silica in Einmal-Trennsäulen in Verbindung mit einem Vakuum-Extraktions-System optimiert. Markierte und unmarkierte Reinsubstanzen von LTB_4 und LTC_4 konnten aus Phosphatpuffer mit einer Recovery von 98±6% bzw. 95±8% zurück erhalten werden, wobei die aufgetragenen Probenvolumina keine Rolle spielten und im unteren Picogramm-Bereich keine unerwünschten Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auftraten. Derartige Probleme wurden von verschiedenen Autoren wiederholt berichtet (109 - 113, 131, 163).

Bis zu einer Menge von 10 ml gefälltem und abzentrifugiertem Urin konnte mit Sicherheit im linearen Kapazitätsbereich der Einmal-Trennsäulen gearbeitet werden (s. Abschnitt 3.1.5.). Bei darüber hinaus gehenden Probenvolumina war ein Rückgang der Wiederfindungsraten auf 20 bis 30% zu verzeichnen (112). Die abschließende Aufreinigung der Urinproben erfolgte durch eine mikroprozessorgesteuerte Auswahl von Abschnitten des HPLC-Chromatogramms. Analog zur Vorextraktion war auch hier eine Feinabstimmung von Säulenmaterial und mobiler Phase notwendig (129 - 131, 144, 169 - 171). Bei Verwendung einer analytischen Säule mit hochgradig nachsilanisiertem ODS-Silica konnten exakte Reverse Phase-Bedingungen erreicht werden (Spherisorb ODS II, 5 µm). Die Aufsättigung der Trennsäule mit den gesuchten Substanzen und der Zusatz von Laufmitteladditiven waren hinfällig (130, 160, 174, 175). Auf komplexe Laufmittelgemische zur Verbesserung der Auftrennung zwischen Isomeren und Metaboliten der Leukotriene konnte ebenfalls verzichtet werden (109, 133, 142, 155, 157, 168).

Mit einem isokratischen Methanol-Wasser-Gemisch gelang es, die Detektionsgrenzen für Standards von PGB_2 und LTB_4 auf 200 bis 500 pg und die von LTC_4 auf 1 ng zu senken. Gegenüber Ergebnissen mit herkömmlichen ODS-Silica-Materialien ergab dies eine Verbesserung um den Faktor 10 (150, 160, 164, 176).

Ein dreistufiges Gradientenprogramm ermöglichte die Darstellung von LTB_4 und LTC_4 in einer Form, in der sie nach entsprechender Vorbereitung mittels spezifischer Radioimmunoassays bzw. GC-MS-Methoden bestimmt werden konnten (258 - 265). Die Überlagerung von PGB_2 mit einem Schmutz-Peak am Beginn des Chromatogramms verhinderte dessen Einsatz als internen Standard. Stattdessen wurden parallele Ansätze mit radioaktiv markierten Proben gefahren und die gesammelten Fraktionen durch Flüssig-Szintillations-Mes-

sung ausgewertet. Die Recovery der HPLC-Aufreinigung von tritiierten Standards aus vorextrahierten Urinproben lagen bei 93% (LTB_4) bzw. 89% (LTC_4) und damit deutlich über den mit herkömmlichen Reverse Phase-Materialien zu erzielenden Ergebnissen (129, 150, 160, 164, 166, 176, 179).

Trotz weitgehender Optimierung gingen von dem Sulfidopeptid-Leukotrien LTC_4 im Verlauf der Aufreinigung 40% des Ausgangsmaterials verloren; bei LTB_4 waren es mehr als 20%. Diese Verluste mußten wegen der Empfindlichkeit der nachfolgenden Meßmethoden gegenüber Störfaktoren in Kauf genommen werden und beruhten nachgewiesenermaßen nicht (LTB_4) oder nur zum geringen Teil (LTC_4) auf chemischer Degradation während der Probenaufarbeitung (131, 137, 142).

Mittlerweile stehen für fast alle pathophysiologisch wichtigen Lipoxygenase-Produkte spezifische Radioimmunoassays zur Verfügung, die Bestimmungen bis in den unteren Picogramm-Bereich hinein zulassen (250 - 257). Für extrahierte und entsprechend markierte Urinproben konnte mittels Immunchromatographie der Einzelfraktionen nachgewiesen werden, daß im Vergleich zu aufgereinigten Standards tatsächlich LTB_4 und LTC_4 gemessen wurden. Unter Berücksichtigung der Recovery wurde etwas mehr als die zu erwartende Substanzmenge wiedergefunden (Grundrauschen, "Blank-Effekt") (135, 161, 184).

Die Reproduzierbarkeit des gesamten Extraktions- und Meßverfahrens wurde durch mitgeführte Standards, intra-assay- und inter-assay-Vergleiche abgesichert. Zusätzlich wurden Eichkurven in biologischem Material angelegt. Die Qualitätskontrollen waren völlig zufriedenstellend (114, 139, 149, 151, 183, 184). Die Gaschromatograhie-Massenspektrometrie hat zwar gegenüber radioimmunologischen Methoden

den Vorteil, mehrere unterschiedliche Substanzen in einer Probe gleichzeitig und exakt als definierte Produkte erfassen zu können, benötigt aber einen großen technischen und experimentellen Aufwand (266 -270). Trotz unterschiedlicher Detektionsmethoden liegt die Nachweisgrenze gerade für cysteinhaltige Leukotriene noch recht hoch (115, 142, 146, 150) (im µg-Bereich).

Gegenüber HPLC, GC-MS und RIA tritt die Dünnschicht-Chromatographie trotz ihres geringen technischen Aufwandes zunehmend in den Hintergrund, da der Zeitbedarf für die Entwicklung des Chromatogramms und die anschließende Detektion mit Autoradiographie oder Radio-Scanning beträchtlich ist. Hinzu kommen mangelnde Empfindlichkeit und oftmals fehlende Auflösungsfähigkeit zwischen nahe verwandten Metaboliten (271).

Die in dieser Arbeit vorgelegten technischen Resultate haben jedoch gezeigt, daß trotz der bekannten Instabilität der Lipoxygenaseprodukte eine schonende Extraktion auch aus komplexen biologischen Materialien und eine exakte Bestimmung bis in den unteren Picogramm-Bereich hinein möglich war.

6.2. Bedeutung der Leukotriene bei Nierentransplantation

Obwohl die pathophysiologische Bedeutung der Leukotriene zunehmend höher eingeschätzt wird, liegen so gut wie keine systematischen Untersuchungen über die Ausscheidung und den Stoffwechsel dieser Substanzen beim Menschen vor. Aus Einzelbeobachtungen ist bekannt, daß verschiedene Zellen des weißen und roten Blutbildes nach Stimulation Lipoxygenaseprodukte bilden (94, 146, 155, 178, 185). Bei Asthmatikern war es möglich, sowohl im Anfall als auch während des Intervalls LTC_4, LTD_4 und LTE_4 im Picogramm-Bereich im Blut nachzuweisen (107, 111, 114). Tierexperimentell wurde gezeigt, daß Leukotriene am isolierten perfundierten Organ als auch in situ vasomotorisch stark wirksam sind und durch spezifische Inhibitoren antagonisiert werden (113, 139, 151, 240, 242, 243).

Da mittlerweile erste Ergebnisse über die Entstehung und den Metabolismus sowie die Ausscheidung von Lipoxygenaseprodukten in der Niere existieren (115, 156), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob im Urin gesunder Erwachsener und nierentransplantierter Patienten unterschiedliche Mengen dieser Substanzen ausgeschieden werden. Nach der vorstehend beschriebenen Probenextraktion und Messung mit spezifischen Radioimmunoassays betrug die tägliche Leukotrienausscheidung im Urin gesunder Erwachsener 181 ng LTB_4 und 28 ng LTC_4 (LTB_4/LTC_4 = 9,5:1). Bei Patienten in der Akutphase nach Transplantation lauteten die Werte: 84 ng LTB_4, 64 ng LTC_4 (LTB_4/LTC_4 = 1,5:1) und in der chronischen Phase: 74 ng LTB_4, 97 ng LTC_4 (LTB_4/LTC_4 = 0,8:1).

Die hier gefundenen Werte liegen um Größenordnungen unter den Mengen an Leukotrienen, die am isolierten perfundierten Organ oder systemisch in vivo zum Einsatz kamen (78 81, 123, 127, 230, 239, 240, 242, 243). Sie werden teilweise ebenfalls von Meßergebnissen direkt an entzündlichem Gewebe (118 - 120, 177, 227) und an Zellen nach Stimulation

bzw. Antigenkontakt übertroffen (178, 182, 216, 220,253, 264, 280).

Die Ausscheidung von LTB_4 der Kontrollgruppe betrug im Mittel mehr als das Doppelte derjenigen beider Patientengruppen. Umgekehrt schieden nierentransplantierte Patienten deutlich mehr LTC_4 aus als die gesunden Erwachsenen. Noch deutlicher wurde dieser Unterschied bei Betrachtung des Verhältnisses beider Metabolite.

Diese Differenzen, wie sie hier in der Exkretion von LTB_4 und LTC_4 im Urin gefunden wurden, können auf die unterschiedliche Entstehung der beiden Substanzen in gesunden bzw. in latent oder chronisch entzündlichen Nieren zurückgeführt werden. Es liegen tierexperimentelle Untersuchungen an intakten Individuen als auch Studien an isolierten Organen mit und ohne pathologische Stimulierung vor, in denen sich ein verändertes Muster der Lipoxygenaseprodukte ergab (111, 113, 156, 216, 237). Andere Autoren fanden unter ähnlichen Bedingungen auch proinflammatorische Prostaglandine und Thromboxan vermehrt (220, 224, 228). Wie bereits erwähnt, ist die Beteiligung der Prostanoide bei pathophysiologischen Vorgängen in der Niere mittlerweile gesichert, wobei der Dualismus zwischen Prostacyclin und Thromboxan bei Nierentransplantaten möglicherweise einen therapeutischen Ansatz eröffnet (23, 26, 28, 29, 31, 34, 43 - 45, 47, 54, 58).

Einen weiteren Hinweis, daß die Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin nierentransplantierter Patienten ein Anzeiger für die immunologische Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit dem Spenderorgan sein könnte, lieferte die zeitliche Aufschlüsselung des Quotienten beider Metabolite. In der Abfolge gesund-akut-chronisch war eine stetige Abnahme des Verhältnisses von LTB_4 zu LTC_4 un-

verkennbar. Zusätzlich zeigte sich mit zunehmendem Alter des funktionsfähigen Transplantats eine verringerte Ausscheidung der Absolutmengen beider Leukotriene. Der Quotient aus LTB_4 zu LTC_4 stieg nach einem Minimum von 0,4:1 im dritten Jahr nach Transplantation wieder auf einen vorläufigen Endwert von 1,0 an (siehe Abb. 68 im Abschnitt 4.4.2.). Aus diesen Ergebnissen ist offenbar ein protektiver Aspekt abzuleiten, wenn die Ausscheidung an LTB_4 überwiegt.

An Versuchen, die Prostanoide und die Lipoxygenaseprodukte hinsichtlich ihrer möglichen Wirkungen auf ein transplantiertes Organ einzuteilen, mangelt es nicht (42,43, 46). FOEGH und Mitarbeiter (289) haben ein System erstellt, die eine Unterteilung nach dem cyclo-AMP-Gehalt und dem membranstabilisierenden Effekt vornimmt. Demnach kämen Prostacyclin, PGE_2, PGD_2 und PGF_2 schützende und Thromboxan sowie den meisten Lipoxygenaseprodukten schädigende Eigenschaften zu. Die Aktivierung des oxidativen Abbaus der Arachidonsäure ist in den immunologischen und zellulären Prozess der Entzündungsabwehr eingebunden. Allerdings wird eingeräumt, daß der konkrete Anteil einzelner Substanzen noch nicht klar abzugrenzen ist.

Aufgrund des vermuteten Zusammenhangs zwischen der Urinausscheidung beider Leukotriene und der Immunitätslage des Organismus wurden die entsprechenden Daten der Patienten in der Akutphase nach Nierentransplantation unter diesem Aspekt näher untersucht. Im Gegensatz zur Gruppe der chronisch transplatierten Patienten konnte hier aufgrund behandelter Abstoßungsreaktionen, der Dauer des stationären Aufenthalts, der Notwendigkeit zur Änderung der immunsuppressiven Medikation und der Organfunktion am Ende des Beobachtungszeitraums eine Einteilung in drei Risikogruppen vorgenommen werden.

Dabei zeigte sich, daß die Patienten mit komplikationsarmem Verlauf im Anschluß an die Nierentransplantation einen Quotienten aus LTB_4/LTC_4 aufwiesen, der über 1,0 lag (Risikogruppe I: Patienten Nr. 3 und 8, Risikogruppe II: Patienten Nr. 7, 11, 4, 10, 2, 9, 1 geordnet nach Rangzahlen). Demgegenüber wiesen die Patienten der Risikogruppe III (Patienten Nr. 5, 6 und 12) mit mehr als drei dokumentierten Abstoßungsreaktionen ein Verhältnis von $LTB_4/LTC_4 \leq 1,0$ auf. Der Verlauf der Quotienten aus beiden Substanzen ist in Abb. 78 dargestellt.

Zusammenfassend läßt sich auch aus den eben vorgestellten Daten und Ergebnissen ableiten, daß dem Quotienten aus LTB_4 und LTC_4 möglicherweise eine prognostische Bedeutung für die spätere Organfunktion zukommt.

Bei dieser Gelegenheit soll nochmals darauf hingewiesen werden, wie problematisch die Erkennung einer Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation sein kann. Trotz maximaler diagnostischer Mittel konnte die organerhaltende Immunsuppression durch hohe Steroiddosen und durch Gabe von Anti-Thymozyten-Globulin erst mit zeitlicher Verzögerung eingeleitet werden. Soweit aus den wenigen untersuchten Fällen ersichtlich, boten weder die Absolutwerte der Leukotrienausscheidung noch der zeitliche Verlauf des Quotienten aus LTB_4/LTC_4 im nachhinein gesehen bei Patienten der Gruppen I und II einen sicheren Anhalt für ein rascheres medikamentöses Eingreifen (Abb. 78).

Der komplikationsreiche Verlauf der Patienten 5, 6 und 12 wird am ehesten aus dem hauptsächlichen Überwiegen von LTC_4 deutlich. Patient 5 sprach auf die erste Steroidgabe (LTB_4/LTC_4 kurzfristig größer als 1,0) gut an, später war wie bei den beiden anderen Patienten keine entsprechende Reaktion mehr zu erkennen. Insgesamt gesehen war es zwar auch bei Patienten der Risikogruppe III nicht möglich, auf-

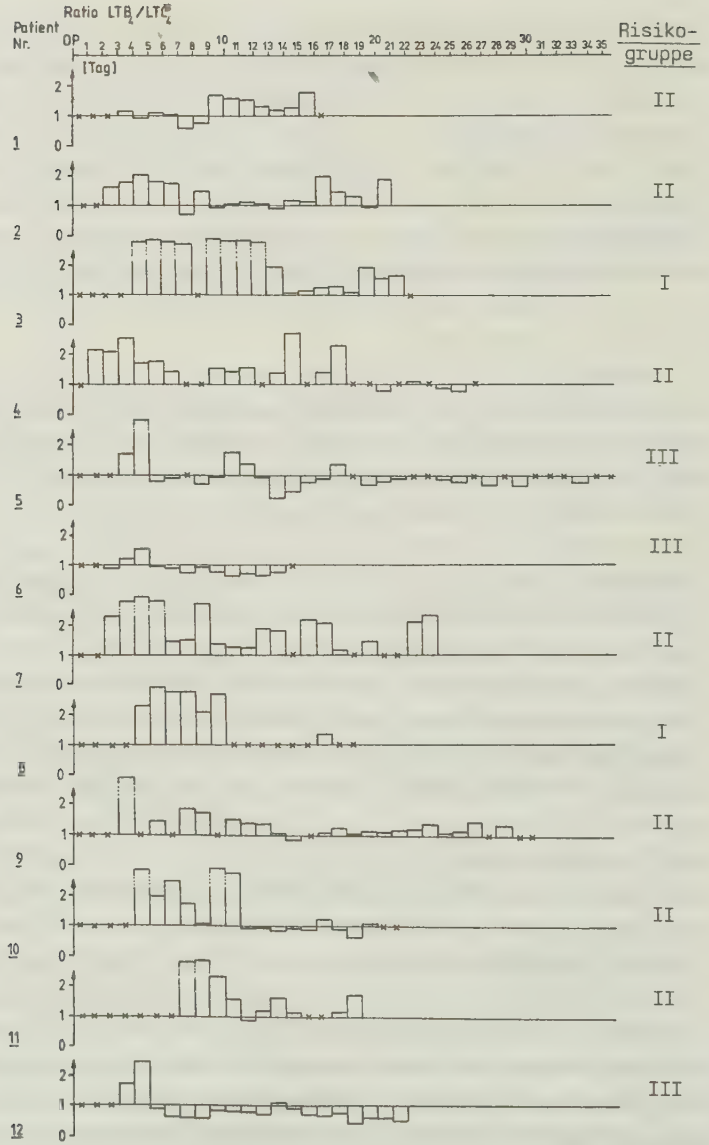


Abb. 78: Zusammenfassende Darstellung des Quotienten aus LTB_4 zu LTC_4 bei allen Patienten während der Akutphase nach Nierentransplantation.

grund der Leukotrienausscheidung Aussagen über unmittelbar bevorstehende Abstoßungsreaktionen zu machen, es darf jedoch in Anbetracht des weiteren, laborchemisch erfaßten Verlaufs vermutet werden, daß die Transplantate keine optimale Funktion mehr erreicht haben.

Eines der Anliegen dieser Arbeit war es, eine Korrelation zwischen der Leukotrienausscheidung im Urin und routinemäßig erhobenen Daten herzustellen. Dazu wurden Angaben aus der Anamnese (Geschlecht, Lebensalter, Dauer der Hämodialyse), routinemäßige Laborparameter (Kreatinin, Harnstoff, Blutbild, Elektrolyte) und Risikofaktoren (Begleiterkrankungen, Zweit-Transplantation, Herkunft des Spenderorgans, HLA-Typisierung) überprüft. Trotz einer umfangreichen Untersuchung ließ sich jedoch kein Index erstellen, der eine globale Aussage über die momentane Transplantatfunktion zuließ und mit der aktuellen Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 in Zusammenhang zu bringen war (290 - 295).

Zur Erhaltung der Organfunktion mußte bei der Hälfte der Patienten, die Azathioprin neben Steroiden zur initialen Immunsuppression erhielten, eine Umstellung auf Ciclosporin A erfolgen (Erweiterung zur Dreifach-Therapie in drei Fällen, Ersatz von Azathioprin durch Ciclosporin A in einem Fall).

Im Anschluß an diese Maßnahme stabilisierte sich die Transplantatfunktion wieder. Immerhin war festzuhalten, daß bei Azathioprin-behandelten Patienten mit einer Ausnahme Abstoßungsreaktionen auftraten, Ciclosporin A-behandelte Patienten wiesen diese Komplikation nicht auf. Dieser Vorteil mußte allerdings durch die im Durchschnitt etwas schlechtere Tranplantatfunktion erkauft werden (1,7 mg/dl gegenüber 2,1 mg/dl Kreatinin). Stets kam es unter Ciclosporin A-Therapie zu einem akuten Nierenversagen (296 - 299).

Die immunsuppressive Therapie mit Ciclosporin A bewirkte eine gegenüber Azathioprin etwas verminderte Ausscheidung beider Leukotriene, insbesondere von LTC_4. Allerdings ließ sich aufgrund der großen Schwankungsbreite der Meßergebnisse ein Unterschied zwischen beiden Therapieformen statistisch nicht absichern. Aus dem deskriptiven klinischen Verlauf und den Quotienten aus LTB_4/LTC_4 für Azathioprin (1,4) und Ciclosporin A (1,8) konnte geschlossen werden, daß Ciclosporin A eine günstigere Prognose hinsichtlich der Transplantatüberlebensrate gewährleistete.

Der Effekt der immunsuppressiven Medikation war bei den Patienten in der chronischen Phase nach Nierentransplantation weniger deutlich ausgeprägt. Unter Ciclosporin A (n=10) lag das Verhältnis aus LTB_4/LTC_4 bei 0,83, mit Azathioprin betrug es 0,76. Immerhin wurde die bereits angesprochene Tendenz des gegenüber Azathioprin verstärkten Einflusses von Ciclosporin A auf die Leukotrien-Synthese deutlich, wobei allerdings ein genauer Ansatzpunkt noch nicht geklärt ist (300).

Interessant war noch die Frage, ob unterschiedlich hohe Dosen von Corticoiden ihren Niederschlag in der Leukotrienausscheidung finden. Dies konnte am ehesten bei chronisch transplantierten Patienten geprüft werden, da hier über einen längeren Zeitraum eine gleichbleibende Medikation gegeben wurde. Wie bereits in der Einleitung und in Abb. 1 angedeutet, war erwartungsgemäß bei niedriger Dosierung des Steroids (weniger als 5 mg/Tag) gegenüber der Vergleichsgruppe (mehr als 5 mg/Tag) die Exkretion von LTB_4 und LTC_4 erhöht. Im Einzelnen ergab sich bei LTB_4 eine Differenz von 86 ng/Tag(<5 mg Steroide/Tag) zu 67 ng/Tag (>5 mg Steroide/Tag). Bei LTC_4 lauteten die Werte 113 ng pro Tag (<5 mg Steroide/Tag) bzw. 87 ng/Tag (>5 mg Steroide pro Tag). Damit konnte die vorherrschende Meinung über den pharmakologischen Effekt der Glucocorticoide auf den

Stoffwechsel der Arachidonsäure bestätigt werden (301).

Zusätzlich ergab sich noch eine synergistische Wirkungsverstärkung zwischen den Steroiden und Ciclosporin A hinsichtlich LTB_4 einerseits sowie zwischen Steroiden und Azathioprin hinsichtlich LTC_4 andererseits. Im ersten Fall wurden 113 ng LTB_4/Tag (<5 mg Steroide/Tag) gegenüber 58 ng LTB_4/Tag (>5 mg Steroide/Tag) ausgeschieden, im zweiten Fall waren es 116 ng LTC_4/Tag (<5 mg Steroide/Tag) im Vergleich zu 83 ng LTC_4/Tag (> 5 mg Steroide/Tag). Glucocorticoide und Ciclosporin A wiesen gegenüber LTC_4 keinen verstärkt supprimierenden Effekt bei erhöhter Steroid-Dosierung auf. Das Ergebnis für die Kombination Glucocorticoide und Azathioprin hinsichtlich LTB_4 war gleichlautend. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu zeigen, wie die Immunsuppressiva Azathioprin und Ciclosporin A in Verbindung mit Steroiden die endogene Produktion von Leukotrienen beeinflussen und an welcher Stelle des Syntheseweges sie ansetzen.

Um die Ergebnisse, die mit der Leukotrienausscheidung der drei Versuchsgruppen erzielt wurden, korrekt bewerten zu können, durften Metabolismus und Stabilität von LTB_4 und LTC_4 nicht unberücksichtigt bleiben. Sowohl als Reinsubstanz in Puffern als auch im Urin war LTB_4 keinen nachweisbaren Abbaureaktionen ausgesetzt, wenn von einer geringfügigen Umlagerung in das 11-trans-Isomer abgesehen wurde. Dies zeigten Untersuchungen mit HPLC, GC-MS und RIA nach vorausgehender Chromatographie. Im menschlichen Plasma wurden Enzymaktivitäten, die LTB_4 in Folgeprodukte verwandeln, ebenfalls nicht beschrieben, dafür fand aber eine Umsetzung von LTC_4 über LTD_4 zu LTE_4 statt (164). Ein ähnlicher Dualismus ist bei Leukozyten anzutreffen, wo eosinophile Zellen LTB_4 nicht metabolisieren können, polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMNL) LTB_4 jedoch zu Verbindungen mit kurzen Retentionszeiten in einem RP-HPLC-

System umwandeln (176). Bei systemischer Infusion von LTB_4 in einen Säugeorganismus entstehen 20-OH-LTB_4 und dessen δ-Lacton sowie 20-CO-LTB_4. Daß tritiiertes LTB_4 schließlich als ^3H-H_2O im Urin auftaucht oder als gasförmiger Metabolit entweicht, spricht für eine β-Oxidation der Kohlenstoffkette vom ω-Ende her (115).

Dieser Stoffwechsel spielt sich offenbar hauptsächlich am $NADPH_2$-abhängigen Cytochrom-P-450-System der Lebermikrosomen ab (90). Bei einer Schädigung des Redox-Systems durch Halocarbone (z.B. Halothan) häufen sich dementsprechend LTB_4-Vorstufen an (Endprodukthemmung). Ein ähnlicher Metabolismus wurde auch für Prostacyclin (PGI_2) und Thromboxan (TXA_2) nachgewiesen (88, 156, 189).

Dagegen konnte LTB_4 unverändert aus dem Perfusionsmedium der isolierten Rattenlunge und nach Instillation in die Atemwege zurückgewonnen werden (275). Demnach ist die Biokonversion von LTB_4 offenbar an bestimmte Zellsysteme gebunden, da menschliche Monozyten, Lymphozyten oder Blutplättchen im Gegensatz zu PMNL diese Eigenschaft nicht besitzen (272 - 274). Der Katabolismus erfolgt bei Körpertemperatur rasch, ist abhängig von der Zellzahl und der Substratkonzentration und außerdem spezifisch für 5(S),12(S)-Dihydroxy-6,8,10,14-eicosatetraensäure (272).

Im Gegensatz dazu erwies sich LTC_4 bereits gegenüber Licht, Luftsauerstoff, Raumtemperatur und bestimmten Lösungsmitteln als instabil (90, 95, 142, 186), wobei LTC_4-Sulfoxid und LTC_4-Sulfon als hauptsächliche Umlagerungsprodukte neben dem 11-trans-Isomer beschrieben wurden (173). Eigene HPLC-Auftrennungen kamen zu dem gleichen Ergebnis. Auffallend war weiterhin, daß der Zerfall in verdünnter Form rascher vonstatten ging als mit der Ausgangskonzentration, was durch den besseren Zutritt von Radikalen erkärt wurde. Als Schutz vor physikalisch-chemischen Degradationsvor-

gängen bei der Langzeitlagerung von Leukotrienen in biologischen Proben wurden methanolische oder äthanolische Lösungen mit Erfolg eingesetzt (103, 107).

Bekannt ist das Vorkommen von Enzymen in der Niere, die LTC_4 zu LTD_4 und LTE_4 umwandeln können (131, 164, 187, 188). Die γ-Glutamyltranspeptidase, die den Schritt LTC_4 zu LTD_4 unter Abspaltung von γ-Glutamyl katalysiert, wurde beispielsweise als Bürstensaum-Enzym beschrieben. Lipoxygenaseaktivität fand sich in intakten Glomeruli, in Epithelzellen und in Tubuli des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle´schen Schleife (TALH). Verschiedene Monohydroxy-Eicosatetraensäuren (HETE´s) waren im Cortex und in der Medulla der Niere anzutreffen (156).

Bei Säugern wurde nach systemischer Applikation von tritiiertem LTC_4 die Hauptmenge der Aktivität neben Galle und Leber in der Niere in Form von unverändertem ^3H-LTC_4 sowie ^3H-LTD_4 und ^3H-LTE_4 nachgewiesen (186). Demnach war ein intensiver Metabolismus der Leukotriene beim Transport mit dem Urin, in dem lösliche Enzyme ebenfalls enthalten sind, aus den Nieren in die Blase zu erwarten. Bei gleichfalls systemischer Gabe fanden andere Untersucher Wasser und Kohlendioxid als hauptsächliche Endmetabolite von LTC_4 (115), wobei jedoch nicht übersehen werden darf, daß bei dieser Applikationsform Organsysteme mit den unterschiedlichsten Metabolisierungseigenschaften passiert werden mußten. Zudem fanden sich in dem genannten Versuch mit einem Warmblüterorganismus auch zahlreiche andere Substanzen, die nach HPLC-Auftrennung als mäßig bis stark polare Stoffe angesprochen wurden.

Anhand eigener Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß LTC_4 bei Inkubationsversuchen mit Urin nierengesunder Probanden zeitabhängig zu Substanzen umgesetzt wurde, die in verschiedenen RP-HPLC-Systemen die gleichen Retentionszei-

ten wie authentisches LTD_4 und LTE_4 aufwiesen. Die Entstehung von LTF_4 durch Kopplung von γ-Glutaminsäure an LTE_4 mittels einer Transpeptidase wäre durchaus denkbar.

Während die Bildung von Sulfoxiden cysteinhaltiger Leukotriene auch in einem zellfreien System durch Reaktion einer Myeloperoxidase in Verbindung mit Wasserstoffperoxid und molekularem Chlor bei 37 °C stattfinden kann, ist die Synthese von LTC_4 und die Konversion zu Folgeprodukten an die Aktivität membrangebundener Enzyme geknüpft (88, 131, 134, 137, 164, 186). Je nach Zelltyp (Peritonealzellen, eosinophile Leukozyten, Leukämie-Zellen, Leberzellen, Mastozytom-Zellen, etc.) (114, 133, 134, 140), notwendigen Cofaktoren und Reaktionstemperaturen laufen die Umsetzungen unterschiedlich rasch bis zu LTE_4 ab (109, 131, 164, 186). Bekannt ist, daß L-Serinborat und Katalase sowohl den Metabolismus von LTC_4 in weitere Sulfidopeptid-Leukotriene als auch die Bildung von Sulfoxiden verhindern (131, 157, 176, 188). Der Schritt von LTD_4 zu LTE_4 kann durch Cystein blokkiert werden (109, 131, 164).

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind auch im Urin eine γ-Glutamyltranspeptidase und eine Dipeptidase vorhanden, die durch die genannten Inhibitoren hemmbar sein sollten. Es bliebe zu untersuchen, welchen Ursprungs die gefundenen Enzymaktivitäten sind. Der bereits genannte Nachweis von Sulfoxiden mit wachsender Inkubationsdauer könnte auf nicht enzymatische Faktoren zurückgeführt werden. Die Biokonversion von LTC_4 zu LTE_4 muß jedoch an membrangebundene Enzyme gekoppelt sein (108, 109, 131, 186, 284). Für diese Stoffwechselleistungen kommen das Urothel und Zellen, die vom Urothel abgegeben werden, in Frage.

Auf jeden Fall muß davon ausgegangen werden, daß cysteinhaltige Leukotriene im Urin einer Metabolisierung ausgesetzt sind. Insofern ist es nicht möglich, ohne sofortige

Fixierung aktuelle Konzentrationen von LTC_4 am gewünschten Ort zu messen. Ferner ist es notwendig, die Geschwindigkeit des Abbaus von LTC_4 zu kennen und gleichzeitig LTE_4 als mutmaßliches Endprodukt der Reaktionsfolge im Urin zu bestimmen.

Um sich einen weiteren Einblick in den Stoffwechsel der Leukotriene im Urin verschaffen zu können, wären weitere Experimente mit möglichst spezifischen Inhibitoren zur Blockade dieser enzymkatalysierten Umsetzungen nötig. Die Abtrennung weiterer Oxidationsprodukte mit HPLC sollte verbessert werden, zusätzliche RIA- und GC-MS-Methoden müßten entwickelt werden, um den Stoffwechsel der Sulfidopeptid-Leukotriene besser untersuchen zu können.

Übertragen auf die Meßergebnisse der Urinausscheidung von Leukotrienen bei gesunden Erwachsenen und nierentransplantierten Patienten bedeutet dies, daß mit dem LTB_4-RIA sicherlich aktuelle Werte gemessen wurden. Von LTC_4 konnte hingegen nur ein Rest erfaßt werden. Da alle Proben auf die gleiche Weise konserviert und aufgearbeitet wurden, muß man davon ausgehen, daß beim Überwiegen von LTC_4 über LTB_4 entweder mehr cysteinhaltiges Leukotrien entstanden ist und/oder bei diesen Patienten die Fähigkeit zur Biokonversion vermindert ist oder fehlt. Diese Eigenschaft kann zum Beispiel eine renale Ursache haben.

Einschränkend muß man sagen, daß die angesprochenen Vermutungen hinsichtlich einer Organ-Funktions-Prognose aufgrund eines positiven Quotienten aus LTB_4/LTC_4 auf einem relativ kleinen Patienten- und Probanden-Kreis beruht. Es ist jedoch ein erster Versuch, Messungen unter diesem Aspekt vorzunehmen. Es zeigt sich auch, daß die Gabe von immunsuppresiven Medikamenten sich im Verhältnis von LTB_4 zu LTC_4 widerspiegelt.

Ähnlich wie bei den beiden Antagonisten Prostacyclin und Thromboxan, wo schon verschiedentlich therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Funktion eines Organtransplantats unternommen wurden, bieten sich bei Lipoxygenaseprodukten in neuerer Zeit ebenfalls mehr medikamentöse Möglichkeiten durch Lipoxygenase-Inhibitoren zur Linderung einer Abstoßungsreaktion an. Dabei kommt Steroiden zunächst noch eine zentrale Bedeutung zu (302, 303). Zunehmend treten jedoch selektive Inhibitoren in den Vordergrund (304 - 310), wobei teilweise auch ein direkter Einfluß auf deletäre Zellen des Immunsystems beschrieben wird (311). Die Wirkungen von Ciclosporin A auf die Kaskade der Cyclooxygenase- und der Lipoxygenase-Produkte werden ebenfalls diskutiert (312 - 316).

6.3. Charakterisisierung der Lipoxygenaseaktivität in Biopsieproben

Wie bereits erwähnt, wird der Verstoffwechselung der Arachidonsäure durch die Lipoxygenase als Ursache für Entzündungsvorgänge grundlegende Bedeutung zugemessen (93, 203, 204, 213, 215 - 217). Zwar ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und M. Crohn die Ätiologie und Pathophysiologie weiterhin ungeklärt, doch erhielten neben den Prostaglandinen jetzt auch Leukotriene und verwandte Substanzen mehr Beachtung (116, 117, 122, 124, 125, 127).

Mit menschlicher Colonmukosa, die aus Operationsmaterial von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gewonnen wurde, konnte radioaktiv markierte Arachidonsäure in vitro zu 2,2% in LTB_4, zu 2,9% in 5-HETE und zu je 3,2% in 12- bzw. 15-HETE umgesetzt werden (121). Die in dieser Untersuchung genannten Prozentsätze stimmen überraschend gut mit unseren Befunden überein (siehe Tab. 18), obwohl wir anstelle der Dünnschicht-Chromatographie eine HPLC-Auftrennung bevorzugten. Während Sharon und Stenson mit Suspensionen homogenisierter Colonmukosa als Quelle für die Lipoxygenase arbeiteten, setzten wir ein teilweise aufgereinigtes Enzym (100 000 g Überstand) in unseren Mikroassay ein. Die Inkubationsbedingungen wurden in Anlehnung an die genannten Autoren gewählt (121).

Sharon und Stenson fanden im Resektionsmaterial aus Colon von fünf Patienten mit Adenocarcinom, die als Kontrollgruppe betrachtet wurden, im Vergleich zu Material von Patienten mit M. Crohn (n=2) und Colitis ulcerosa (n=4) erniedrigte prozentuale Bildungsraten an LTB_4 und Monohydroxy-Eicosatetraensäuren. Sie schlossen daraus auf eine gesteigerte Synthese von Lipoxygenaseprodukten bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

In einer anderen Untersuchung konnten die gleichen Autoren zeigen, daß im Rahmen einer experimentell erzeugten Colitis beim Tier neben kleinen Mengen an Prostaglandinen LTB_4 und eine Reihe von HETE´s nachweisbar waren (220). Das Spektrum der gefundenen Substanzen stimmte mit demjenigen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bei Menschen überein.

Wir konnten an Hand unserer umfangreicheren Vergleichsstudie an identischen Patienten (n=12) diesen Sachverhalt nur für 5-, 12- und 15-HETE bestätigen. Höhere Bildungsraten an verschiedenen Monohydroxy-Eicosatetraensäuren wurden ebenfalls im Homogenat aus Colonmukosa bei Patienten mit Colitis ulcerosa gefunden (116). Neben Berichten über die Freisetzung von LTC_4 aus Colongewebe nach Stimulierung mit einem Antigen (221) liegen auch Ergebnisse über spezifische Rezeptoren für Leukotriene an der Muscularis und an Zellfragmenten von Darmpräparaten vor (222). Außerdem findet in den verschiedenen Schichten der intakten bzw. der entzündlich veränderten Darmwand ein intensiver Stoffwechsel und Abbau von Prostaglandinen und Leukotrienen statt (223 - 225).

Als Fazit der genannten Literaturbefunde und unserer eigenen Untersuchungen läßt sich vermuten, daß den Monohydroxy-Eicosatetraensäuren bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine pathophysiologische Rolle zukommt. Auch bei Zahnfleischentzündungen war 12-HETE als einziges mit GC-MS-Technik nachweisbares Lipoxygenaseprodukt zu finden (121). Dennoch kann man davon ausgehen, daß je nach Organlokalisation weitere Lipoxynoide entstehen können (227 - 231).

Bei allen bisherigen Untersuchungen war jedoch zu berücksichtigen, daß in unterschiedlichem Ausmaß fast alle Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit Medikamenten behandelt wurden (Corticosteroide, Sulfasalazin,

5-Aminosalicylsäure). Ein Einfluß dieser Begleitmedikation auf den in vitro gemessenen Arachidonsäurestoffwechsel bzw. auf die Lipoxygenaseaktivität konnte daher nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Bei dem vorliegenden Studienansatz dürfte diese theoretisch mögliche Wechselwirkung jedoch dadurch eliminiert werden, daß zum gleichen Zeitpunkt beim identischen Patienten entzündete und nicht erkrankte Colonmukosa mit der Biopsiezange gewonnen und diese Proben auch parallel aufgearbeitet wurden.

Man kann daher davon ausgehen, daß zumindest bei Colitis ulcerosa in der entzündeten Colomukosa eine erhöhte Lipoxygenaseaktivität anzutreffen ist, die insbesondere zu einem Anstieg der biologisch aktiven Monohydroxy-Eicosatetraensäuren (HETEs) führt. Es erschien deshalb sinnvoll, spezifische Lipoxygenase-Inhibitoren für die Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu entwickeln und klinisch einzusetzen wie dies zum Teil für Prostaglandine schon geschehen ist (232 - 235). Ein bescheidener Anfang in diese Richtung wurde bereits mit 5-Aminosalicylsäure eingeleitet, die bei Colitis ulcerosa und M. Crohn wirksam ist (236) und die in vitro konzentrationsabhängig das Enzym Lipoxygenase hemmen kann (232).

7. Zusammenfassung

Leukotriene sind hochaktive Mediatoren für entzündliche und allergische Prozesse, die durch Lipoxygenasereaktionen aus Arachidonsäure entstehen. Ihre pathophysiologische Bedeutung als Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) bei Asthma, Allergie, Trauma, Schock und bei immunologischen Prozessen ist bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Lipoxygenaseprodukten bei Nierentransplantation und bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersucht.

Die Analytik von LTB_4 und LTC_4 im Urin erforderte nach Proteinfällung mit eiskaltem Äthanol eine mehrstufige Extraktion auf Einmal-Trennsäulen, die eine möglichst homogene Beschichtung des Trägermaterials Silica mit C_{18}-Ketten aufwiesen. Die beiden Leukotriene eluierten bei einem Methanolgehalt von 85% und einem pH-Wert von 8,0.

Die weitere Aufreinigung mit einem mikroprozessorgesteuerten HPLC-System erfolgte über ein Gradientenprogramm an einer 5 µm-C_{18}-Säule und mit einem gepufferten Methanol-Wasser-Gemisch als Laufmittel.

Zur Messung von LTB_4 und LTC_4 standen zwei Radioimmunoassays mit spezifischen Antikörpern zur Verfügung. Die Detektionsgrenzen lagen zwischen 10 pg/Test und 1 000 bzw. 1600 pg/Test für LTB_4 bzw. LTC_4. Die Gesamtrecovery der Aufarbeitung betrug für LTB_4 77%, für LTC_4 etwa 59%. Die Qualität der Probenextraktion und -messung wurde durch mitgeführte Standards, intra- und inter-assay-Vergleiche und durch Eichkurven in biologischem Material gesichert.

LTB_4 war während der Lagerung als Reinsubstanz, in biologischen Proben und bei der Inkubation mit Urin nierengesun-

der Erwachsener unter physiologischen Bedingungen stabil (HPLC, RIA, GC-MS). Dagegen trat bei LTC_4 eine chemische Umlagerung zum 11-trans-Isomer und zum Sulfoxid auf. Enzymatisch wurde LTC_4 im Urin über LTD_4 zu LTE_4 mit einer Halbwertszeit von etwa 6 Stunden umgesetzt. Im Urin war LTE_4 ein stabiles Endprodukt der Sulfidopeptid-Leukotriene.

Die Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin nierengesunder Versuchspersonen wurde mit denjenigen von Patienten in der akuten bzw. in der chronischen Phase nach Nierentransplantation verglichen. In Relation zu transplantierten Patienten schieden gesunde Erwachsene deutlich mehr LTB_4 aus. Umgekehrt waren die Meßwerte der Transplantat-Träger an LTC_4 gegenüber den Teilnehmern der Kontrollgruppe erhöht.

Patienten mit komplikationsarmem postoperativem Verlauf wiesen ein Verhältnis von LTB_4 zu LTC_4 größer als 1,0 auf, bei Patienten mit mehreren Abstoßungsreaktionen lag der Quotient unter 1,0. Bei Patienten während der chronischen Phase nach Nierentransplantation besserte sich der Quotient nach kurzfristigem Überwiegen von LTC_4 wieder zugunsten von LTB_4 und wurde mit einer zunehmenden Akzeptanz des Transplantats erklärt.

Patienten unter Azathioprin wiesen mehr Abstoßungsreaktionen auf als diejenigen, die mit Ciclosporin A therapiert wurden. Bei der letztgenannten Gruppe lag der LTB_4/LTC_4-Quotient höher als mit konventioneller Immunsuppression.

Eine positive Korrelation der Leukotrienausscheidung zu anamnestischen Daten, Laborparametern oder Risikofaktoren konnte nicht hergestellt werden. Dafür zeigte sich die Auswirkung der Medikation mit Steroiden auf die Meßwerte der Leukotriene, wobei sich mit Ciclosporin A für LTC_4 und mit Azathioprin für LTB_4 ein additiver Effekt ergab.

Obwohl der Ausscheidung von LTB_4 und LTC_4 im Urin nicht die Bedeutung eines Warnsymptoms für eine drohende Abstoßungsreaktion zukam, war der Verlauf von Meßwerten beider Substanzen möglicherweise als prognostisches Zeichen für die spätere Organfunktion zu verwerten. Eine medikamentöse Beeinflussung des Lipoxygenase-Stoffwechsels erscheint vorteilhaft.

Zur Untersuchung der Lipoxygenaseaktivität von Patienten mit Colitis ulcerosa und M. Crohn wurden Biopsieproben aus gesunden und aus entzündlich veränderten Darmabschnitten entnommen. Nach Inkubation mit einem Ca-Ionophor sowie markierter und unmarkierter Arachidonsäure wurde eine Zwei-Phasen-Flüssig-Extraktion mit anschließender Reverse Phase-HPLC durchgeführt. Unmarkierte Proben wurden zusätzlich radioimmunologisch gemessen.

Bei diesen internen cross-over-Versuchen wurden nur wenige Prozent der eingesetzten Arachidonsäure metabolisiert. Während sich bei Leukotrienen (LTB_4 und LTC_4) keine Differenz zwischen gesundem und erkranktem Gewebe finden ließ, wurden in Proben aus entzündlichem Material deutlich mehr mono-Hydroxyeicosatetraensäuren nachgewiesen. Damit konnte trotz Medikation mit Steroiden, 5-Aminosalicylsäure und Sulfasalazin eine gesteigerte Aktivität der Lipoxygenase bestätigt werden. Therapeutische Ansätze zur Beeinflussung der Lipoxygenaseaktivität liegen vor.

8. Literaturverzeichnis

(1) SCHREINER, G.E.
Past, present, and future of transplantation.
Kidney International 23 (Suppl. 14), 4 - 9, 1983

(2) PORTER, K.A., RANDELL, J.M., STOLINSKI, C., TERASAKI, P.J., MARCHIORO, T.L., STARZL, T.E.
Light and electron microscopic study of biopsies from 33 human renal allografts and an isograft 1 3/4 to 2 1/2 years after transplantation.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 129, 615 - 618, 1966

(3) WILLIAMS, G.M., WHITE, H.J., HUME, D.M.
Factors influencing the long term functional success rate of human renal allografts.
Transplantation 5, 837 - 841, 1967

(4) STROM, T.B., GAVAROY, M.R.
Clinical and experimental aspects of renal allograft rejection.
Am. J. Kidney Dis. 1, 5 - 11, 1981

(5) CARPENTER, C.B., AUSTEN, K.F.
The early diagnosis of renal allograft rejection.
In: Human Transplantation, ed. RAPAPORT, F.T., DAUSSET, J., Grune & Stratton, New York and London 1968

(6) COSIMI, A.B., COLVIN, R.B., BURTON, R.C., RUBIN, R.H., GOLDSTEIN, G., KUNG, P.C., HANSEN, W.P., DELMONICO, F.L., RUSSELL, P.S.
Use of monoclonal antibodies to T- ell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts.
N. Engl. J. Med. 305, 308 - 314, 1981

(7) COLVIN R.B., COSIMI, A.B., BURTON, R.C., DELMONICO, F.L., JAFFERS, G., TOLLKOFF-RUBIN, N.E., GIORGI, J.V., McCLUSKEY, R., RUSSELL, P.S.
Circulating T-cell subsets in human renal allograft recipients: The OKT 4+/OKT 8+ cell ratio correlates with reversibility of graft injury.
Abstr. 9th Int. Congr. Transplant. Soc. 1982, abstr. F 15:2

(8) ELLIS, T.M., BERRY, C.R., MUAKASSA, W., LEE, H.M., MOHANAKUMAR, T.
T-lymphocyte subpopulations in renal allograft recipients: alterations associated with allograft status, immunosuppressive therapy, and blood transfusion.
Abstr. 9th Int. Congr. Transplant. Soc. 1982, abstr. F 22:2

(9) BUKLEY, W., VALENZUELA, R., BRAUN, W., DEADHAR, S.D., NOVICK, A.C., STEINMÜLLER, D.R.
Flow cytometry quantitation of peripheral blood T-cell subsets in human allograft recipients.
Abstr. 9th Int. Congr. Transplant. Soc. 1982, abstr. F 22:4

(10) KERMAN, R.H., PAYNE, W.D., FLECKNER, S.
Monitoring of T-cell subsets and immune events in renal allograft recipients.
Abstr. 9th Int. Congr. Transplant. Soc. 1982, abstr. F 22:5

(11) NANNI COSTA, A., VANGELISTA, A., STEFONI, S., BONOMINI, V.
T-cell subsets in renal allograft recipients.
Abstr. 9th Int. Congr. Transplant. Soc. 1982, abstr. P 8:7

(12) SMITH, W.J., BURDICK, J.F., WILLIAMS, G.M.
Immunological monitoring of renal transplant recipients.
Abstr. 9th Int. Congr. Transplant. Soc. 1982, abstr. P 15:1

(13) BARKE, J.R., COUNAHAN, R., HILSON, A.J.W., MAISEY, M.N., BUNICK, M., OGG, C.S., CHANTLER, C.
Serial quantitative imaging with 99-Tc^m-DTPA in pediatric renal transplantation.
Clin. Nephrol. 12, 174 - 177, 1979

(14) MOLDE, A., ASPELIN, P., HILDELL, J., HUSBERG, B.S., NYMAN, U.
Evaluation of transplanted kidneys with computed tomography and ultrasound.
Scand. J. Urol. Nephrol. 64, 230 - 236, 1981

(15) GRINO, J.M., ALSINA, J., MARTIN, J., ROCA, M., CASTELAO, A., ROMERO, R., CARALPS, A.
Indium-111-labeled autologous platelets as a diagnostic method in kidney allograft rejection.
Transplant. Proc. 14, 198 - 200, 1982

(16) LEITHNER, C., SINZINGER, H.
Indium-111-labeled platelets for diagnosis of acute kidney-transplant rejection treatment.
Wien. Klin. W. 96 (3), 112 - 117, 1984

(17) STERIOFF, S., EUGEN, D.E., TRACY, R., YOUNG, D.S., ZINCKE, H.
Biochemical analysis of renal transplant rejection.
Transplant. Proc. 13, 1747, 1981 (Abstract).

(18) GEORGE, C.R.P., SLICHTER, S.J., QUADRACCI, S.J., STRIKER, G.E., HARKER, L.A.
A kinetic evaluation of hemostasis.
N. Engl. J. Med. 291, 1111 - 1115, 1974

(19) WHITE, J., MEYER, E., HARDY, M.A.
Prediction of onset and termination of renal allograft rejection by serum levels of C-reactive protein.
Transplant. Proc. 13, 682 - 685, 1981

(20) ROSE, D.M., SIDDIQUI, F., SANTHANAM, S., DEL GRECO, F., WOLF, J.
Rationale and application of beta-2-microglobulin measurements to detect acute transplant rejection.
Nephron 27, 260 - 264, 1981

(21) VON WILLEBRAND, E., TASKINEN, E., HAYRY, P.
Recent modifications in the fine needle aspiration biopsy of human renal allografts.
Abstr. 9th Int. Congr. Transplant. Soc. 1982, abstr. F 5:5

(22) WOOD, R.F.M., BOLTON, E.M., THOMPSON, J.F., MORRIS, P.J.
Monoclonal antibodies and fine needle aspiration cytology in detecting renal allograft rejection.
Lancet 2, 278, 1982

(23) OKAHARA, T., IMAMISHI, M., YAMAMOTO, K.
Zonal heterogeneity of prostaglandin and thromboxane release in the dog kidney.
Prostaglandins 25 (3), 373 - 384, 1983

(24) ÅNGGÅRD, E.
Formation and metabolism of prostaglandins in the kidney.
Kidney International 19, 771 - 780, 1981

(25) LIFSCHITZ, M.D.
Prostaglandins and renal blood flow: in vivo studies.
Kidney International 19, 781 - 785, 1981

(26) WINTER, M., FRAMPTON, G., BENNETT, A., MACHIN, S.J., CAMERON, J.S.
Synthesis of thromboxane B_2 in uremia and the effects of dialysis.
Thromb. Res. 30 (3), 265 - 272, 1983

(27) SUN, F.F.
Metabolism of prostaglandins in the kidney.
Kidney International 19, 760 - 770, 1981

(28) SCHWARTZ, D., DE SCHRYVER-KECSMETI, K., NEEDLEMAN, P.
Renal arachidonic acid metabolism and cellular changes in the rabbit renal vein constricted kidney: inflammation as a common process in renal injury models.
Prostaglandins 27 (4), 604 - 612, 1984

(29) PATRONO, C.
Evidence for a renal origin of urinary TXB_2 in health and disease.
Adv. in Prostaglandins, Thromboxane and Leukotriene-Research, vol. 11, 493 -498, 1983

(30) KRONBERG, I.J., RADRAN, G., ZIPSER, R.D.
Urinary excretion of prostaglandins and thromboxane in the hepatorenal syndrome.
Adv. in Prostaglandins, Thromboxane and Leukotriene-Research, vol. 11, 539 - 542, 1983

(31) VESTERQUIST, O., GREEN, K.
Urinary excretion of 2,3-dinor-thromboxane B_2 in man under normal conditions, following drugs and during some pathological conditions.
Prostaglandins 27 (4), 627 - 644, 1984

(32) FERRERI, N.R., McGIFF, J.C., MILLER, M.J.S., SCHWARTZMAN, M., SPOKAS, E.G., WONG, P.Y.K.
The kidney and arachidonic acid metabolism.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 481 - 485, 1983

(33) JONAS, P.E., DE SCHRYVER, K., OKEGAWA, T., LEAHY, K., NEEDLEMAN, P.
Presence of inflammatory cells associated with exaggerated arachidonic acid metabolism in renal injury.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 12, 65 - 73, 1983

(34) FOEGH, M.L., WINCHESTER, J.F., ZUNDKA, M., HELFRICH, G.B., RAMWELL, P.W., SCHREINER, G.E.
Aspirin inhibition of thromboxane release in thrombosis and renal tranplant rejection.
Lancet 1, 48 - 49, 1982

(35) RING, J., SEIFERT, J., MERTIN, J., BRENDEL, W.
Prolongation of skin allografts in rats by treatment with linoleic acid.
Lancet 2, 1331 - 1335, 1974

(36) MERTIN, J., HUNT, R.
Influence of polyunsaturated fatty acids on survival of skin allografts and tumor incidence in mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 928 - 931, 1976

(37) MEDAWAR, P., HUNT, R., MERTIN, J.
An influence of diet on transplantation immunity.
Proc. R. Soc. London 206 B, 265 - 280, 1979

(38) MERTIN, J.
Effect of polyunsaturated fatty acids on skin allograft survival and primary and secondary cytotoxic response in mice.
Transplantation 21, 1 - 4, 1976

(39) KORT, W.J., WEIJMA, J.M., WESTBROEK, D.L.
Effect of stress and dietary fatty acids on allograft's survival in the rat.
Eur. Surg. Res. 11, 434 - 444, 1979

(40) McHUGH, M.J., WILKINSON, R., ELLIOT, R.W.
Immunosuppression with polyunsaturated fatty acids in renal transplantation.
Transplantation 24, 263 - 267, 1977

(41) DUPONT, E., WYBRAN, J., TOUSSAINT, C.
Glucocorticosteroids and organ transplantation.
Transplantation 37, 331 - 335, 1984

(42) ANDERSON, C.B., JAFFE, B.M., GRAFF, R.J.
Prolongation of murine skin allografts by prostaglandin F.
Transplantation 23, 444 - 447, 1977

(43) STROM, T.B., CARPENTER, C.B.
Prostaglandin as an effective antirejection therapy in rat renal allograft recipients.
Transplantation 35, 279 - 281, 1983

(44) LEITHNER, C., SINZINGER, H., SCHWARTZ, M.
Treatment of chronic kidney transplant rejection with prostacyclin: reduction of platelet deposition in the transplant.
Prostaglandins 22, 783 - 788, 1981

(45) SHAW, F.L.
Prolongation of rat cardiac allograft survival by treatment with prostacyclin or aspirin during acute rejection.
Transplantation 35, 526 - 529, 1983

(46) KORT, W.J., BONTA, J.L., ADOLFS, M.J.P., WESTBROEK, D.L.
Synergism of prostaglandin E with either azathioprine or prednisolone on the survival of heart allografts in rats.
Prostaglandin, Leukotriene, Med. 8, 666 - 664, 1982

(47) MUNDY, A.R., BEWICK, M., MONCADA, S., VANE, R.
Experimental assessment of prostacyclin in the harvesting of kidneys for transplantation.
Transplantation 30, 251 - 255, 1980

(48) GOTO, T., HEBERMAN, R.B., MALNISK, A., STRONG, D.M.
Cyclic-AMP as an mediator of PGE-induced suppression of human natural killer cell activity.
J. Immunol. 130, 1350 - 1355, 1980

(49) LIFSCHITZ, M.D., BARNES, J.L.
Prostaglandin I_2 attenuates ischemic acute renal failure in the fat.
Am. J. Physiol. 247 (5, Pt. 2), F 714 - F 717, 1984

(50) MANDAL, A.K., MILLER, J.
Protection against ischemic acute renal failure by prostaglandin infusion.
Prostaglandins, Leukotriene, Med. 8, 361 - 373, 1982

(51) KHIRABADI, B.S., FOEGH, M.L., RAMWELL, P.W.
Urine immunoreactive thromboxane B_2 in rat cardiac allgraft rejection.
Transplantation 39 (1), 6 -8, 1984

(52) TANNENBAUM, J.S., ANDERSON, C.B., SICARD, G.A. McKEEL, D.W., ETHEREDGE, E.E.
Prostaglandin synthesis associated with renal allograft rejection in the dog.
Transplantation 37 (5), 438 - 443, 1984

(53) BRADLEY, J.W., CHO, S.I., MURRAY, J.C., BAKER, K., NABSETH, D.C.
The use of prostacyclin for pretreatment of kidney donors.
Transplant. Proc. 15 (1, book 1), 424 - 426, 1983

(54) FOEGH, M.L., ZMUDKA, M., COOLEY, C., WINCHESTER, J.F., HELFRICH, G.B., RAMWELL, P.W.
Urine immunoreactive TXB_2 in renal allograft rejection.
Lancet 2, 431 - 434, 1981

(55) MAINDMANT, G.C., DAWSON, C.M.
Platelet thromboxane production in renal failure and after transplantation.
Clin. Sci. 65 (3), P 28 - P 29, 1983

(56) ZIPSER, R.D., SMORLESI, C.
Regulation of urinary thromboxane B_2 in man: influence of urinary flow rate and tubular transport.
Prostaglandins 27 (2), 257 - 270, 1984

(57) JOERGENSEN, K.A., KEMP, J., BARFORT, P., STARKLINT, H., LARSEN, S., PETERSEN, P.H., KNUDSEN, J.G.
The survival of pig to rabbit renal xenografts during inhibition of thromboxane synthesis.
Thromb. Res. 32 (6), 585 - 591, 1983

(58) RAMWELL, P.W., SCHREINER, G.E.
Aspirin inhibition of thromboxane release in thrombosis and in renal transplant rejection.
Lancet 1, 48 - 49, 1982

(59) FOEGH, M.L., ALIJANI, M.R., HELFRICH, G.B.
Thromboxane and leukotrienes in clinical and experimental rejection.
in: Platelets, Prostaglandins, and cardiovascular system, ed. NERI-SERNERI, S., Raven Press, New York, 1986

(60) FEUERSTEIN, N., RAMWELL, P.W.
OKY-1581, a potential selective thromboxane synthetase inhibitor.
Eur. J. Pharmacol. 69, 533 - 534, 1981

(61) FOEGH, M.L., ALIJANI, M., HELFRICH, G.B., KIRABADI, B.S., RAMWELL, P.W.
Prolongation of cardiac allograft survival with the PAF antagonist BN 52021 and with the thromboxane receptor antogonist L 640035 and L 626499.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 1986

(62) RIJK, G.L., FOEGH, M.L., RAMWELL, P.W., GOLDMAN, M., LOWER, R.R.
Long-term myocardial preservation: thromboxane production and coronary resistance.
J. Surg. Res. 35, 417 - 420, 1983

(63) MILLER, J.J.
The imidazoles as immunosuppressive agents.
Transplant. Proc. 12, 300 - 303, 1980

(64) SALAMAN, J.R., GRIFFIN, P.J.A., JOHNSON, R.W.G.
A controlled clinical trial of niridazole in cadaver renal transplantation.
Transplant. Proc. 12, 297 - 299, 1980

(65) CALUE, R.Y.
Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purin analogues.
Transplant. Bull. 28, 65 - 81, 1961

(66) BLACKWELL, G.J., CARNUCCIO, R.
Suppression of arachidonate oxidation by glucocorticoid-induced antiphospholipase peptides.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 65 - 71, 1983

(67) HIRATA, F.
Lipomodulin: a possible mediator of the action of glucocorticoids.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 73 - 78, 1983

(68) ROTHHUT, B., CLOIX, J.F., RUSSO-MARIE, F.
Dexamethasone induces the synthesis of "renocortins", two antiphospholipase proteins in rat renomedullary interstitial cells in culture.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 12, 51 - 56, 1983

(69) SAMUELSSON, B.
Von Untersuchungen biochemischer Mechanismen zu neuen biologischen Mediatoren: Prostaglandinendoperoxide, Thromboxane und Leukotriene (Nobelvortrag).
Angew. Chemie 95, 854 - 864, 1983

(70) SIROIS, P.
From Slow Reacting Substance of Anaphylaxis to LTD_4.
Int. J. Immunopharmacol. 2, 281 - 293, 1980

(71) SAMUELSSON, B.
Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.
Science 220, 568 - 575, 1983

(72) LEWIS, R.A., LEE, C.W., LEVINE, L., MORGAN, R.A., WEISS, J.W., DRAZEN, J.M., OH, H., HOOVER, D., COREY, E.J., AUSTEN, K.F.
Biology of the C-6-sulfidopeptide leukotrienes.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 15 -26, 1983

(73) HAMMARSTRÖM, S.
Leukotrienes.
Ann. Rev. Biochem. 52, 355 - 377, 1983

(74) FELDBERG, W., KELLAWAY, C.H.
Liberation of histamine and formation of lysolecithin-like substances by cobra venom.
J. Physiol. 94, 187 - 226, 1938

(75) HEDQUIST, P., DAHLEN S.E.
Pulmonary and vascular effects of leukotrienes imply involvement in asthma and inflammation.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 27 -32, 1983

(76) SAMUELSSON, B.
Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 1 -13, 1983

(77) WILLIAMS, T.J., JOSE, P.J., WEDMORE, C.V., PECK, M.J.
The importance of synergism between prostaglandin-, leukotriene-, and complement-derived peptides.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 33 - 37, 1983

(78) BJÖRCK, J., DAHLEN, S.E., HEDQUIST, P., ARFORS, K.E.
Leukotrienes B_4 and C_4 have distinct microcirculatory actions in vivo.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 12, 1 -7, 1983

(79) DRAZEN, J.M., AUSTEN, K.F., LEWIS, R.A., CLARK, D.A.
Comparative airway and vascular activities of LTC_4 and LTD_4 in vivo and in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci.USA 77, 4354 - 4358, 1980

(80) DAHLEN, S.E., BJÖRCK, J., HEDQUIST, P.
Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response.
Proc. Natl. Acad. Sci.USA 78, 3887 - 3891, 1981

(81) WILLIAMS, T.J., PIPER, P.J.
The action of chemically pure SRS-A and the microcirculation in vivo.
Prostaglandins 19, 779 - 789, 1980

(82) BRAY, M.A., CUNNINGHAM, F.M., FORD-HUTCHINSON, A.W., SMITH, M.J.H.
LTB_4: a mediator of vascular permeability.
Br. J. Pharmacol. 72, 483 - 486, 1981

(83) BEAUBIEN, B.C., TIPPINS, J.R.
Quantitation of LTC_4, D_4 and E_4 released by pathophysiological stimuli.
Prostaglandins 28 (5), 638 - 639, 1984

(84) SRAER, J., RIGAUD, M., BENS, M., RABINOVITCH, H., ARDAILLOU, R.
Metabolism of arachidonic acid via the lipoxygenase pathway in human and murine glomeruli.
J. Biol. Chem. 258 (7), 4325 - 4330, 1983

(85) SPOKAS, E.G., McGIFF, J.C.
Renal vascular effects of metabolism of 15-HPETE in Krebs-perfused rabbit kidneys.
Circulation 70 (4), 239, 1984 (Abstract).

(86) HENDERSON, W.R., KLEBANOFF, S.J.
Leukotriene B_4, C_4, D_4, and E_4 inactivation by hydroxyl radicals.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 110 (1), 266 - 272, 1983

(87) FEUERSTEIN, G.
Leukotrienes and the cardiovascular system.
Prostaglandins 27 (5), 781 - 802, 1984

(88) JAKSCHIK, B.A., KUO, C.G.
Characterization of LTA_4 and B_4 synthesis.
Prostaglandins 25 (6), 767 - 782, 1983

(89) ROLA-PLESZCZYNSKI, M., GAGNON, L.
Human natural cytotoxic cell activity: enhancement by LTA_4, C_4, and D_4, but not by stereoisomers of LTB_4 or HETE's.
Prostaglandin, Leukotriene, Med. 13, 113 - 117, 1983

(90) BÖRSTERLING, B., TRUDELL, J.R.
Leukotriene B_4 metabolism by hepatic cytochrome P-450.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 114 (2), 850 - 854, 1983

(91) EVANS, J., FORD-HUTCHINSON, A.W., FITZSIMMONS, B., ROKACH, J.
Biological activities of isomers of 8, 15-di-hydroxyeicosatetranoic acid.
Prostaglandins 28 (3), 435 - 438, 1984

(92) FLEISCH, J.H., RINKEMA, L.E., MARSHALL, W.S.
Pharmacologic receptors for the leukotrienes.
Biochem. Pharmacol. 33 (24), 3919 - 3922, 1984

(93) HIGGS, G.A., MONCADA, S.
Leukotrienes in disease. Implications for drug development.
Drugs 30, 1 - 5, 1985

(94) LEWIS, R.A., AUSTEN, K.F.
The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, function, pharmacology.
J. Clin. Invest. 73, 889 - 897, 1984

(95) KATORI, M., UENO, A., TANAKA, K.
Roles of leukotrienes in non-allergic and allergic inflammatory models.
Prostaglandins 28 (5), 617 - 619, 1984

(96) FUJIMOTO, Y., TANIOKA, H.
Inhibition of prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla slices by antioxidants.
J. Pharm. Pharmacol. 36 (3), 195 - 196, 1984

(97) PARKER, C.W., HUBER, M.M., FALKENHEIN, S.F.
Pharmacologic characterization of SRS-A.
Methods Enzymology 86, 655 - 667, 1982

(98) WEBB, D.R., NOWOWIEJSKI, J., HEALY, C., ROGERS, T.J.
Immunosuppressive properties of LTD_4 and LTE_4 in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 1617 -1622, 1982

(99) ROLA-PLESZCZINSKI, M., BORGEAT, P., SIROIS, P.
Leukotriene induces human suppressor lymphocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 1531 - 1537, 1982

(100) PAYAN, D.G., GOETZL, E.J.
Specific suppression of human T-lymphocyte function by leukotriene B_4.
J. Immunol. 131, 551 - 553, 1983

(101) BAILEY, J.M., BRAYANT, R.W., LOW, C.E., PUPILLO, L.M., VANDERHOEK, J.Y.
Regulation of T-lymphocyte mitogenesis by the leukocyte product 15-HETE.
Cell. Immunol. 1, 266 - 270, 1981

(102) PAYAN, D.G., GOETZL, E.J.
The dependance of T-lymphocyte migration on the 5-lipoxygenation of endogenous arachidonic acid.
J. Clin. Immunol. 1, 266 -270, 1981

(103) NACCACHE, P.H., SHA'AFI, R.J., BORGEAT, P., GOETZL, E.J.
Mono- and di-HETE's alter calcium homeostasis in rabbit neutrophils.
J. Clin. Invest. 67, 1584 - 1587, 1981

(104) FORD-HUTCHINSON, A.W., BRAY, M., DOIG, M., SHIPLAY, M., SMITH, M.
Leukotriene B_4: a potent chemokinetic and aggregating substance released from PMNL.
Nature 286, 264 - 265, 1980

(105) RAMWELL, P.W., KARAMIAN, J., FOEGH, M.L.
The molecular basis of the pharmacology of the arachidonate metabolites.
In: Prostaglandins and cancer, ed. POWLES, T., BACHMAN, R., HOUN, K., RAMWELL. R., Alan Liss, New York 1982, pp 46 - 67.

(106) SERHAN, C.N., HAMBERG, M., SAMUELSSON, B.
Novel mechanisms in the arachidonic acid cascade relating to inflammation.
Abstr. 3rd Int. Conf. Inflamm., Paris 1984

(107) MORRIS, H.R., CLINTON, P.M., TAYLOR, G.W., PIPER, P.J., TIPPINS, J.R., BARNETT, K.
Extraction of leukotrienes from biological fluids: studies with tritium-radiolabeled and unlabeled leukotrienes.
Prostaglandins Ser. 3, 64 - 69, 1983

(108) SAAD, M.H., BURKA, J.F.
Isolation of leukotriene C_4 from human seminal fluid.
Prostaglandins 26 (6), 943 - 954, 1983

(109) DOBSON, P., AHARONY, D., KRELL, R.D.
Development of a sensitive method for measurement of leukotriene production by isolated cells.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 42 (1), 3 - 23, 1983

(110) POWELL, W.S.
Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using ODS-Silica.
Methods Enzymol. 86, 467 - 477, 1982

(111) MORRIS, H.R., TAYLOR, G.W., CLINTON, R.M., PIPER, P.J., TIPPINS, J.R., BARNETT, K., COSTELLO, J., DUNLOP, L., HENDERSON, A., HEATON, R.
Measurement of leukotrienes in asthmatics.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 221 - 228, 1983

(112) LUDERER, J.R., RILEY, D.L.
Rapid extraction of arachidonic acid metabolites using ODS-Reverse phase-columns.
J. Chromatogr. 273, 402 - 409, 1983

(113) CLANCY, R.M., HUGLI, T.E.
The extraction of leukotrienes (LTC_4, LTD_4, and LTE_4) from tissue fluids: the metabolism of these mediators during IgE-dependant hypersensitivity reactions in lung.
Anal. Biochem. 133, 30 - 39, 1983

(114) BEAUBIEN, B.C., TIPPINS, J.R., MORRIS, H.R.
Leukotriene biosynthesis and metabolism detected by the combined use of HPLC and radioimmunoassay.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125 (1), 97 - 104, 1984

(115) SERAFIN, W.E., OATES, J.A.
Metabolism of leukotriene B_4 in the monkey. Identification of the principle nonvolatile metabolite in the urine.
Prostaglandins 27 (6), 899 - 911, 1984

(116) BOUGHTON-SMITH, N.K., HAWKEY, C.J., WHITTLE, B.J.R.
Biosynthesis of lipoxygenase and cyclooxygenase products from ^{14}C-arachidonic acid by human colonic mucosa.
Gut 24, 1176 - 1182, 1983

(117) BENNETT, A., HENSBY, C.N., SANGER, G.J., STAMFORD, I.F.
Metabolites of arachidonic acid formed by human gastrointestinal tissues and their actions on the muscle layers.
Br. J. Pharmacol. 74, 535 - 544, 1981

(118) SHARON, P., STENSON, W.F.
Enhanced synthesis of leukotriene B_4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease.
Gastroenterology 86, 453 - 460, 1984

(119) KLICKSTEIN, L.B., SHAPLEIGH, C., GOETZL, E.J.
Quantitation of LTB_4 at inflammatory sites (synovial fluid).
J. Clin. Invest. 66, 1166 - 1170, 1980

(120) DAVIDSON, E.M., RAE, S.A.
Leukotriene B_4, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis.
Ann. Rheum. D. 42 (6), 677 - 679, 1983

(121) SIDHAGEN, B., HAMBERG, M., FREDHOLM, B.B.
Formation of 12-L-HETE by gingival tissue.
J. Dent. Res. 61 (6), 761 - 763, 1982

(122) DONOWITZ, M.
Arachidonic acid metabolites and their role in inflammatory bowel disease. An update requiring addition of a pathway.
Gastroenterology 88 (2), 580 - 587, 1985

(123) GOLDENBERG, M.M.
The effect of LTD_4 on the isolated stomach and colon of the rat.
Life Sci. 33 (21), 2121 - 2127, 1983

(124) WÖLBING, R.H., AEHRINGHAUS, U., PESKAR, B.A., MORGENROTH, K., PESKAR, B.M.
Release of SRS-A and LTC_4-like material from guinea pig colonic tissue.
Prostaglandins 25 (6), 809 - 822, 1983

(125) CAPASSO, F., TAVARES, J.E., BENNETT, A.
The production of arachidonate lipoxygenase products by rat intestine is increased by phenolphthalein.
Eur. J. Pharmacol. 106, 419 - 422, 1985

(126) ALY, A., JOHANSSON, C., SLEZAK, P., GREEN, K.
Bioconversion of arachidonic acid in the human gastrointestinal tract.
Biochem. Med. 31 (3), 319 - 331, 1984

(127) MUSCH, M.W., MILLER, R.J., FIELD, M., MARVIN, I.
Stimulation of colonic secretion by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid.
Science 217 (4566), 1255 - 1256, 1982

(128) MATHEWS, W.R.
Analysis of leukotrienes by HPLC.
Anal. Biochem. 118, 96 - 101, 1981

(129) OSBORNE, D.J., PETERS, B.J., MEADE, C.J.
The separation of LT's and HETE's and further metabolites of arachidonic acid by HPLC.
Prostaglandins 26 (5), 817 - 832, 1983

(130) PETERS, S.P., SCHULMAN, E.S., LIU, M.C., MAYES, E.C., LICHTENSTEIN, L.M.
Separation of major prostaglandins, leukotrienes, and mono-HETE's by HPLC.
J. Immunol. Methods 64, 335 - 343, 1983

(131) RYDZIK, R., TERRAGNO, A., TACKETT, R.
Picogram detection of eicosanoids by ultraviolet absorbance after narrow-bore HPLC. Comparison with conventional-bore column.
J. Chromatogr. 308, 31 - 41, 1984

(132) KUO, C.G., LEWIS, M.T.
LTD_4 and LTE_4 formation by plasma membrane bound enzymes.
Prostaglandins 28 (6), 929 - 938, 1984

(133) MURPHY, R.C., MATHEWS, W.R.
Purification and characterization of leukotrienes from mastocytoma cells.
Methods Enzymol. 86, 409 - 416, 1982

(134) MANNERVIK, B., JENSSON, H., AALIN, P., OERNING, L., HAMMARSTRÖM, S.
Transformation of leukotriene A_4 methyl ester to leukotriene C_4 monomethylester by cytosolic rat glutathione transferases.
FEBS Lett. 175 (2), 289 - 293, 1984

(135) SALMON, J.A., SIMMONS, P.M., PALMER, R.M.J.
A radioimmunoassay for leukotriene B_4.
Prostaglandins 24, 225 - 235, 1982

(136) YOUNG, R.N., ZAMBONI, R., ROKACH, J.
Studies in the conjugation of LTB_4 with proteins for development of RIA for LTB_4.
Prostaglandins 26 (4), 605 - 614, 1983

(137) ROSENKRANZ, B., KITAJIMA, W., FRÖLICH, J.C.
Prostacyclin - a renal hormone?
In: Biochemistry of kidney function, INSERM Symposium Nr. 21: ed. MOREL, F., Elsevier Biomedical Press B.V. 1982

(138) JAKSCHIK, B.A., HARPER, T., MURPHY, R.C.
The 5-lipoxygenase and leukotriene forming enzymes.
Methods Enzymol. 86, 30 - 37, 1982

(139) UENO, A., TANAKA, K.
Detection of LTC_4 and LTD_4 in the exsudate of rat carrageenin-induced pleurisy.
Prostaglandins 26 (3), 493 - 504, 1983

(140) PARKER, C.W., FALKENHEIM, S.F., HUBER, M.M.
Production and purification of SRS-A from RBL-1 cells.
Methods Enzymol. 86, 416 - 426, 1982

(141) HANDLER, J.S.
Vasopressin-Prostaglandin interactions in the regulation of epithelial cell permeability to water.
Kidney International 19, 831 - 838, 1981

(142) WESTCOTT, J.Y., CLAY, K.L., MURPHY, R.C.
Decomposition of leukotriene C_4.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (3), 363 - 368, 1984

(143) NUGTEREN, D.H.
Arachidonic acid 12-lipoxygenase from bovine platelets.
Methods Enzymol. 86, 49 - 54, 1982

(144) VERHAGEN, J., WALSTRA, P., VELDINK, G.A.
Separation and quantitation of leukotrienes by Reverse phase HPLC.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 13, 15 - 20, 1984

(145) MAAS, R.L., LAWSON, J.A., BRASH, A.R., OATES, J.A.
Derivatization and analysis of leukotrienes by desorption-chemical ionization mass spectrometry at subnanomole level.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 229 - 234, 1983

(146) MacDERMOT, J., KELSEY, C.R., WADDELL, K.A., RICHMOND, R., KNIGHT, R.K., COLE, P.J., DOLLERY, C.T., LANDON, D.N., BLAIR, I.A.
Synthesis at leukotriene B_4 and prostanoids by human alveolar macrophages: analysis by gas chromatography/mass spectrometry.
Prostaglandins 27 (2), 163 - 178, 1984

(147) STEFFENRUD, S., BORGEAT, P.
Derivatization of leukotrienes for GC-MS.
Prostaglandins 28 (5), 593 - 596, 1984

(148) TAYLOR, G.W., MORRIS, H.R., BEAUBIEN, B., CLINTON, P.M.
Fast atom bombardment mass spectrometry of eicosanoids.
Prostaglandins Ser. 3, 277 - 282, 1983

(149) DAMON, M., CHAVIS, C., GODARD, P., MICHEL, F.P.
Purification and mass spectrometry identification of leukotriene D_4 synthesized by human alveolar macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 111 (2), 518 - 524, 1983

(150) SAUTEBIN, L., CARUSO, D., GALLI, G.
Analysis of cyclooxygenase and lipoxygenase products in incubation and perfusion media.
Pers. Mitteilung

(151) HAYES, E.C., LOMBARDO, D.L., GIRARD, Y., MAYCOCK, A.L., ROKACH, J., ROSENTHAL, A.S., YOUNG, R.N., EGAN, R.W., ZWEERINK, H.J.
Measuring leukotriens of SRS-A: development of a specific RIA.
J. Immunol. 131 (1), 429 - 433, 1983

(152) CODDE, J.P., BARDEN, A., VANDONGEN, R., BEILIN, L.J.
Validation of the direct radioimmunoassay of prostanoids in serum and kidney.
Prostaglandins, Leukotriens, Med. 14 (1), 55 - 64, 1984

(153) ZIJLSTRA, F.J., VINCENT, J.E.
Determination of leukotrienes and prostaglandins in ^{14}C-arachidonic acid labeled human lung tissue by HPLC and RIA.
J. Chromatogr. 311 (1), 39 - 50, 1984

(154) LEWIS, R.A., MENCIA-HUERTA, J.M., SOBERMAN, R.J., HOOVER, D., MARFAT, A., COREY, E.J., AUSTEN, K.F.
Radioimmunoassay for leukotriene B_4.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (24), 7904 - 7908, 1982

(155) DU, J.T., FOEGH, M., MADDOX, Y., RAMWELL, P.W.
Human peritoneal macrophages synthesize leukotrienes B_4 and C_4.
Biochem. Biophys. Acta 753 (2), 159 - 163, 1983

(156) FERRERI, N.R., SCHWARTZMAN, M., IBRAHIM, N.G., CHANDLER, P.N., MacGIFF, J.C.
Arachidonic acid metabolism in a cell suspension isolated from rabbit renal outer medulla.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 231 (2), 441 - 448, 1984

(157) BERNSTROEM, K., OERNING, L., HAMMARSTRÖM, S.
Gamma-glutamyl transpeptidase, a leukotriene metabolizing enzyme.
Methods Enzymol. 86, 38 - 45, 1982

(158) POWELL, W.S.
Separation of unlabeled metabolites of arachidonic acid from their deuterium- and tritium-labeled analogs by argentation-HPLC.
Anal. Biochem. 128 (19), 93 - 103, 1983

(159) STENSON, W.F., PARKER, C.W.
Metabolism of arachidonic acid in ionophore-stimulated neutrophils.
J. Clin. Invest. 64, 1457 - 1465, 1984

(160) METZ, S.A., HALL, M.E., HARPER, T.W., MURPHY, R.C.
Rapid extraction of leukotrienes from biologic fluids and quantitation by HPLC.
J. Chromatogr. 233, 193 - 201, 1982

(161) SALMON, J.A., FLOWER, R.J.
Extraction an thin-layer chromatography of arachidonic acid metabolites.
Methods Enzymol. 86, 477 - 493, 1982

(162) HAEGGSTROEM, J., FITZPATRICK, F., RÅDMARK, O., SAMUELSSON, B.
Albumin stabilizes 14,15-leukotriene A_4.
FEBS Lett. 164 (1), 181 - 184, 1983

(163) POWELL, W.S.
Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using ODS-Silica.
Prostaglandis 20, 947 - 957, 1980

(164) KÖLLER, M.
The metabolism of leukotrienes in blood plasma studied by HPLC.
Biochem. Biophys. Acta 833, 128 - 134, 1985

(165) GREEN, K., HAMBERG, M., SAMUELSSON, B.
Extraction and chromatographic procedures for purification of prostaglandins, thromboxane, prostacyclin, and their metabolites.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 5, 15 - 38, 1978

(166) ELING, T.
Separation of arachidonic acid metabolites by HPLC.
Methods Enzymol. 86, 511 - 517, 1982

(167) BACH, M.K., BRASHLER, J.R.
A comparison of the leukotriene synthesizing ability of subfractions of rat liver glutathione-S-transferase.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 17 (1), 125 - 136, 1985

(168) LEE, C.W., COREY, E.J., AUSTEN, K.F.
The myeloperoxidase-dependant metabolism of leukotrienes C_4, D_4, and E_4 to 6-trans-leukotriene B_4 diastereoisomers and the subclass-specific S-diastereoisomeric sulfoxides.
J. Biol. Chem. 258 (24), 15 004 - 15 010, 1983

(169) HADDAD, P.R., DROUEN, A.C.J.H., BILLIET, H.A.H., DE GALAN, L.
Combined optimization of mobile phase pH and organic modifier content in the separation of some aromatic acids by reverse phase HPLC.
J. Chromatogr. 282, 71 -81, 1983

(170) MASTERS, D.J., McMILLAN, R.M.
Improved reverse phase HPLC assay for LTB_4.
Prostaglandins Ser. 3, 275 - 276, 1983

(171) GOLDBERG, A.P.
Comparison of columns for reverse phase HPLC
Anal. Chem. 54, 342 - 345, 1982

(172) HEIMAN, A.S., CREWS. F.T.
Hydrocortisone selectively inhibits IgE-dependant arachidonic acid release from rat peritoneal mast cells.
Prostaglandins 27 (2), 335 - 342, 1984

(173) FITZPATRICK, F.A., LIGGETT, W.F., MORTON, D.R., PIKE, J.E.
The stability of leukotrienes.
Prostaglandins Ser. 3, 78 - 89, 1983

(174) ANDERSON, F.S., WESTCOTT, J.Y., ZIROLLI, J.A., MURPHY, R.C.
Ethylenediaminetetraacetic acid in liquid chromatography of leukotrienes.
Anal. Chem. 55 (11), 1837 - 1839, 1983

(175) GOLDMAN, M.E., BEAULIEU, M., ESKAY, R.L., KEBABIKAN, J.W.
Dyes permit immediate evaluation of HPLC-system performance. Application to HPLC with RIA-detection.
J. Chromatogr. 275 (2), 407 - 410, 1983

(176) WELLER, P.F., LEE, C.W., FORSTER, D.W., COREY, E.J., AUSTEN, K.F., LEWIS, R.A.
Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotrien C_4.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7626 - 7630, 1983

(177) BRAIN, S.D., CAMP, R.D.R., DOWD, P.M., BLACK, A.K., WOOLLARD, P.M., MALLET, A.I., GREAVES, M.W.
Psoriasis and leukotriene B_4.
Lancet 2 (8301), 762 - 763, 1982

(178) BISGAARD, H., FORD-HUTCHINSON, A.W., CHARLESON, S., TAUDORF, E.
Detection of leukotriene C_4-like immunoreactivity in tear fluid from subjects challenged with specific antigen.
Prostaglandins 27 (3), 369 - 374, 1984

(179) COCKRELL, C.S., ELLIS, E.S.
Simple single-step HPLC method for the separation of cyclooxygenase and lipoxygenase enzyme metabolites of arachidonic acid.
J. Chromatogr. 308, 316 - 321, 1984

(180) HAWKEY, C.J., KARMELI, F., RACHMILEWITZ, D.
Imbalance of prostacyclin and thromboxane synthesis in Crohn's disease.
Gut 24 (10) 881 - 885, 1983

(181) RAMPTON, D.S., SLADEN, G.E.
Relationship between rectal mucosal prostaglandin production and water and electrolyte transport in ulcerative colitis.
Digestion 30 (1), 13 - 22, 1984

(182) CAPASSO, F., TAVARES, I.E., BENNET, A.
The production of arachidonate lipoxygenase products by rat intestine is increased by phenolphthalein.
Eur. J. Pharmacol. 106 (2), 419 - 422, 1984

(183) AEHRINGHAUS, U., WOELBING, R.H., KOENIG, W.
Release of LTC_4 from human PMNL as determined by RIA.
FEBS Lett. 146, 111 - 114, 1982

(184) ROKACH, J., HAYES, E.C., GIRARD, Y., LOMBARDO, D.L., MAYCOCK, A.L., ROSENTHAL, A.S., YOUNG, R.N., ZAMBONI, R., ZWEERINK, H.J.
The development of sensitive and specific radioimmunassays for leukotrienes.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 13, 21 - 25, 1984

(185) LINDGREN, J.A., HAMMARSTROEM, S., GOETZL, E.J.
A sensitive and specific radioimmunoassay for leukotriene C_4.
FEBS Lett. 152 (1), 83 - 88, 1983

(186) HAMMARSTROEM, S., HEDQUIST, P., LUNDBERG, J.M., HUA, X.Y., DAHLEN, S.E.
Action and metabolism of circulating leukotriene C_4.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (3, Pt. 2), 358 - 362, 1984

(187) MATSUDA, Y., TSUJI, A., KUNO, T.
Biosynthesis and degradation of gamma-glutamyl-transpeptidase of rat kidney.
J. Biochem. 94 (3), 755 - 765, 1983

(188) OERNING, L., HAMMARSTROEM, S.
Inhibition of LTC_4 and D_4 biosynthesis.
J. Biol. Chem. 225, 8023 - 8026, 1980

(189) BRASH, A.R., JACKSON, E.K., LAWSON, J.A., BRANCH, R.A.
Quantitative aspects of prostacyclin metabolism in humans.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 119 - 122, 1983

(190) BACH, M.K., BRASHLER, J.R., MORTON, D.R.
Solubilization and characterization of the leukotriene C_4 synthetase of rat basophil leukemia cells: a novel, particulate glutathione S-transferase.
Arch. Biochem. Biophys. 230 (2), 455 - 465, 1984

(191) SACHS, L.
Angewandte Statistik.
Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage

(192) WINER, B.J.
Statistical principles in experimental design.
McGraw-Hill Kogakusha Ltd., Tokyo, 2nd ed., 1971

(193) LOESCHE, W., BOSIA, A., CARUSO, D., SPANGENBERG, P., PESCARMONA, G.P., HOFMANN, J., GALLI, G., ARESE, P., PAOLETTI, R.
Dependance of arachidonic acid metabolism in human blood platelets on reduced coenzymes.
Biomed. Biochem. Acta 43 (8 - 9), 362 - 365, 1984

(194) CHAPNICK, B.M.
Divergent influences of leukotrienes C_4, D_4, and E_4 on mesenteric and renal blood flow.
Am. J. Physiol. 246 (4, Pt. 2) H 518 - H 524, 1984

(195) AHARONY, D., DOBSON, P.
Discriminative effect of gamma-glutamyltranspeptidase inhibitors on metabolism of leukotriene C_4 in peritoneal cells.
Life Sci. 35 (21), 2135 - 2142, 1984

(196) SCHNERMANN, J.
Participation of renal cortical prostaglandins in the regulation of glomerular filtration rate.
Kidney International 19, 802 - 815, 1981

(197) SALARI, H., BRAQUET, P., BORGEAT, P.
Comparative effects of indomethacin, acetylenic acids, 15-HETE, nordihydroguiaretic acid, and BW 755 C on the metabolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 13, 53 - 60, 1984

(198) SALMON, J.A.
Analysis of cyclooxygenase and lipoxygenase products in inflammatory exsudate: why measure?
Pers. Mitteilung

(199) PIPER, P.J:
Preparation, purification, and structure elucidation of SRS-A from guinea pig lung.
Methods Enzymol. 86, 426 - 435, 1982

(200) MATHEWS, W.R.
Inhibition of leukotriene biosynthesis in mastocytoma cells by diethylcarbamazepin.
Biochem. Pharmacol. 31 (11), 2129 - 2132, 1982

(201) MURPHY, R.C., HAMMARSTROEM, S., SAMUELSSON, B.
LTC_4: A SRS-A from murine mastocytoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4275 - 4279, 1979

(202) OERNING, L., HAMMARSTROEM, S., SAMUELSSON, B.
LTD_4: A SRS-A from rat basophilic leukemia cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2014 - 2017, 1980

(203) FORD-HUTCHINSON, A.W.
Leukotriene involvement in pathologic processes.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (3, Pt. 2), 437 - 440, 1984

(204) ALEXANDER, F., MATHIESON, M., TEOH, K.H.T., HUVAL, W.V., LELCUK, S., VALERI, C.R., SHEPRO, D., HECHTMAN, H.G.
Arachidonic acid metabolites mediate early burn edema.
J. Trauma 24 (8), 709 - 712, 1984

(205) BACH, M.K.
Prospects for the inhibition of leukotriene synthesis.
Biochem. Pharmacol. 33 (4), 515 - 521, 1984

(206) BONNEY, R.J., HUMES, J.L.
Physiological and pharmacological regulation of prostaglandin and leukotriene production by macrophages.
J. Leukocyte Biol. 35 (1), 1 - 10, 1984

(207) BRAIN, S., CAMP, R.D.R., DOWD, P., BLACK, A.D., GREAVES, M.
The release of leukotriene B_4-like material in biologically active amounts from the lesional skin of patients with psoriasis.
J. Invest. Dermatol. 83 (1), 1 - 10, 1984

(208) BRASH, A.R., MAAS, R.L., OATES, J.A.
On the mechanism of biosynthesis of 5- and 15-series leukotrienes.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (3, Pt. 2), 316 - 323, 1984

(209) BRAY, M.A.
The pharmacology and pathophysiology of LTB_4.
Br. Med. Bull. 39 (3), 249 - 254, 1983

(210) FITZPATRICK, F., LIGGETT, W., McGEE, J., BUNTING, S., MORTON, D., SAMUELSSON, B.
Metabolism of leukotriene A_4 by human erythrocytes. A novel cellular source of LTB_4.
J. Biol. Chem. 259 (18), 11403 - 11407, 1984

(211) FORD-HUTCHINSON, A.W., FITZSIMMONS, B., ROKACH, J.
Biological activities of isomers of 8,15-dihydroxy-eicosatetraenoic acid.
Prostaglandins 28 (3), 435 - 438, 1984

(212) GOETZL, E.J., PAYAN, D.G., GOLDMAN, D.W.
Immunopathogenetic roles of leukotrienes in human diseases.
J. Clin. Immunol. 4 (2), 79 - 84, 1984

(213) HEDQUIST, P., DAHLEN, S.E.
Leukotrienes as mediators of allergic and inflammatory reactions.
Prostaglandins Ser. 3, 134 - 151, 1983

(214) PIPER, P.J.
Pharmacology of leukotrienes.
Br. Med. Bull. 39 (3), 255 - 259, 1983

(215) PIPER, P.J.
The evolution and future horizons on research on the metabolism of arachidonic acid by 5-lipoxygenase.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (3, Pt. 2) 441 - 444, 1984

(216) SIMMONS, P.M., SALMON, J.A., MONCADA, S.
The release of leukotriene B_4 during experimental inflammation.
Biochem. Pharmacol. 32 (8), 1353 - 1359, 1983

(217) WILLIAMS, T.J., JOSE, P.J., WEDMORE, C.V., PECK, M.J., FORREST, M.J.
Mechanisms underlying inflammatory edema: the importance of synergism between prostaglandins, leukotrienes, and complement-derived peptides.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 33 - 37, 1983

(218) SERHAN, C.N., HAMBERG, M., SAMUELSSON, B.
Trihydroxytetraens: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 118 (3), 943 - 949, 1984

(219) SERHAN, C.N., HAMBERG, M., SAMUELSSON, B.
Lipoxins: a novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (17), 5335 - 5339, 1984

(220) SHARON, P., STENSON, W.F.
Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. Similarity to human inflammatory bowel disease.
Gastroenterology 88 (1), 55 - 63, 1985

(221) PESKAR, P.M., WOELBING, R.H.
Antigen stimulated liberation of LTC_4 in colon tissue of guinea pigs.
Z. Gastroent. 21 (8), 396, 1983 (Abstract).

(222) KRILIS, S., LEWIS, R.A., COREY, E.J., AUSTEN, K.F.
Specific bindung of leukotriene C_4 to ileal segments and subcellular fractions of ileal smooth muscle cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (14), 4529 - 4533, 1984

(223) PETRY, F.M., TUTTON, P.J.M., BARKLA, D.H.
The influence of arachidonic acid metabolites on cell division in the intestinal epithelium and in colonic tumors.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 15, 349 - 358, 1984

(224) CRAVEN, P.A., DE RUBERTIS, F.R.
Patterns of prostaglandins synthesis and degradation in isolated superficial and proliferative colonic epithelial cells compared to residual colon.
Prostaglandins 26 (4), 583 - 604, 1983

(225) KAO, H.W., FONG, D.
Increased prostanoid production by colonic muscularis in colitis.
Gastroenterology 86 (5), 1129, 1984 (Abstract).

(226) STENSON, W.F., LOBOS, E.
Sulfosalazine inhibits the synthesis of chemotactic lipids by neutrophils.
J. Clin. Invest. 69, 494 - 497, 1982

(227) BRAIN, S.D., CAMP, R.D.R., CUNNINGHAM, F.M., DOWD, P.M., GREAVES, M.W., BLACK, A.K.
Leukotriene B_4-like material in scale of psoriatic skin lesions.
Br. J. Pharmacol. 83 (1), 313 - 317, 1984

(228) EGG, D.
Concentrations of prostaglandins D_2, E_2, F_2, 6-keto-$F_{1\alpha}$, and thromboxane B_2 in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and osteoarthritis.
Z. Rheumatol. 43 82), 89 - 96, 1984

(229) FITZPATRICK, F., HAEGGSTROEM, J., GRANSTROEM, E., SAMUELSSON, B.
Metabolism of leukotriene A_4 by an enzyme in blood plasma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (17), 5425 - 5429, 1983

(230) LETTS, L.G., CIRINO, M.
The actions of leukotrienes on blood vessels in vivo.
Prostaglandins 28 (5), 602 - 604, 1984

(231) OERNING, L., HAMMARSTROEM, S.
Isolation and characterization of 15-hydroxylated metabolites of leukotriene C_4.
FEBS Lett. 153 (2), 253 - 256, 1983

(232) PESKAR, P.M.
Effects of sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid on the human colonic prostaglandin system.
Symp. Giovanni Lorenzini Found. 17, 185 - 196, 1983

(233) BRANSK, D., SHARON, P.
Effect of cimetidine on human gastric and duodenal prostanoid synthesis.
Sc. J. Gastroenterology 19(84), 457 - 460, 1984

(234) MILLER, T.A.
Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage - current knowledge and proposed mechanisms.
Am. J. Physiol. 245 (5), G 601 - G 623, 1983

(235) LAURITZEN, K., HANSEN, J.
Effects of sulfasalazine and azodisalicylate on colonic PGE_2 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of faeces in patients with ulcerative colitis and healthy controls.
Gastroenterology 86 (5), 1154, 1984 (Abstract).

(236) KLOTZ, U., MAIER, K.E.
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. Behandlung mit einer neuen Substanz.
Therapiewoche 35, 3895 - 3903, 1985

(237) JONAS, P.E., LEAHY, K.M., DE SCHRYVER-KECSKEMETI, K., NEEDLEMAN, P.
Cellular interactions and exaggerated arachidonic acid metabolism in rabbit renal injury.
J. Leukocyte Biol. 35 (1), 55 - 64, 1984

(238) MILLET, V.G., RUILOPE, M.
Participation of renal prostaglandins in the nephrotic syndrome.
Kidney International 23 (3), 555, 1983

(239) ROSENTHAL, A., PACE-ASCIAK, C.R.
Potent vasoconstriction of the isolated perfused rat kidney by leukotrienes C_4 and D_4.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 61 (4), 325 - 328, 1983

(240) FEIGEN, L.P.
Differential effects of LTC_4, D_4, and E_4 in the canine renal and mesenteric vascular beds.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 225 (3), 682 - 687, 1983

(241) FEIGEN, L.P., PRETUS, H.A.
Lipoxynoids and the kidney.
Prostaglandins 28 (5), 658, 1984

(242) BADR, K.F., BAYLIS, C.
Renal and systemic hemodynamic responses to intravenous infusion of LTC_4 in the rat.
Circ. Res. 54 (5), 492 - 499, 1984

(243) YOSHIZAWA, M.
Renal vascular effects of LTC_4 in the isolated perfused rat kidney.
Pers. Mitteilung

(244) FEIGEN, L.P.
Influence of renal lipoxygenase activity on the renal vascular response to arachidonic acid.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 228 (1), 140 - 146, 1984

(245) PLANTE, G.E., HERBERT, R.
Leukotrienes B_4 and D_4 and the renal transport of ions.
Prostaglandins Suppl. 27, 54, 1984

(246) FILEP, J., RIGTER, B.
Effect of synthetic leukotriene C_4 on the renal electrolyte excretion in the conscious rat.
Prostaglandins Suppl. 27, 34, 1984

(247) FERRERI, N.R., SCHWARTZMAN, M.
Arachidonic acid metabolism in the rabbit thick ascending limb of Henle's loop.
Prostaglandins Suppl. 27, 6, 1984

(248) O'REGAN, S., TURGEON, C.
Arachidonic acid infusion in rabbits. Renal pathologic alterations.
Pathol. Res. Pract. 176 (2 - 4), 297 - 305, 1983

(249) DAS, I.
Improved sample preparation and rapid extraction of prostacyclin and thromboxane metabolites from biological samples by using reverse phase ODS-Silica cartridges.
Biochem. Soc. Trans. 12 (5), 834 - 835, 1984

(250) WYNALDA, M.A., BRASHLER, J.R., BACH, M.K., MORTON, D.R., FITZPATRICK, F.A.
Determination of leukotriene C_4 by radioimmunoassay with a specific antiserum generated from a synthetic hapten mimic.
Anal. Chem. 56 (11), 1862 - 1865, 1984

(251) SALMON, J.A., SIMMONS, P.M., PALMER, R.M.J.
Release of leukotriene B_4 from human neutrophils measured by specific radioimmunoassay.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 215 - 220, 1983

(252) HAYES, E.C., LOMBARDO, D.L., GIRARD, Y., MAYCOCK, A.L., ROKACH, J.
Leukotriene specific radioimmunoassays.
Prostaglandins Ser. 3, 26 - 43, 1983

(253) FORDER, R.A., CAREY, F.
Human 5-lipoxygenase measurement by RIA of LTB_4 in Ca-ionophore stimulated blood.
Prostaglandins 28 (5), 666, 1984

(254) BRYANT, R.W., HWANG, D.H.
Development of a radioimmunoassay for 15-HETE and its application to 15-HETE production by reticulocytes.
Prostaglandins 26 (3), 375 - 386, 1983

(255) AHARONY, D., DOBSON, P., BERNSTEIN, P.R., KUNSER, E.J., KRELL, R.D., SMITH, J.B.
Determination of SRS-A release from guinea pig lungs by a radioimmunoassay.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 117 (2), 574 - 579, 1983

(256) YOUNG, R.N.,KAKUSHIMA, M., ROKACH, J.
Studies on the preparation of conjugates of leukotriene C_4 with proteins for development of an immunoassay for SRS-A.
Prostaglandins 23 (4), 603 - 613, 1982

(257) LEVINE, L., LEWIS, R.A., AUSTEN, K.F., COREY, E.J.
Radioimmunoassay of the 6-sulfidopeptide-leukotrienes and serological specificity of the anti-leukotriene D_4 plasma.
Methods Enzymol. 86, 252 - 258, 1982

(258) WILLIAMSON, P.K., ZURIER, R.B.
Derivatization, separation and direct quantitation of mono-HETE's using RP-HPLC.
J. Liquid Chromatogr. 7 (11), 2193 - 2201, 1984

(259) JUBIZ, W., NOLAN, G., KALTENBORN, K.C.
An improved technique for extraction, separation, and quantitation of peptidoleukotrienes.
Abstr. of Kyoto Conf. Eicos.

(260) BORGEAT, P., SALARI, H., PICARD, S.
Profiling of lipoxygenase products of arachidonic acid in biological samples by RP-HPLC and dual wavelength UV detection.
Abstr. of Kyoto Conf. Eicos.

(261) BOWERMASTER, J., McNAIR, H.
Microbore HPLC: speed, efficiency, sensitivity, and temperature programming.
J. Chromatogr. 279, 431 - 438, 1983

(262) ERBIL, K.M., ROMERO, S.D.
Comparison of 3 and 5 µm column packings for the separation of prostaglandins by HPLC.
Clin. Chem. 30 (6), 1052, 1984

(263) HENKE, D.C., KOUZAN, S.
Analysis of prostaglandins, leukotrienes, and other oxygenated metabolites of arachidonic acid by HPLC.
Anal. Biochem. 140 (1), 87 - 94, 1984

(264) ZILTENER, H.J., JOERG, A.
Leukotriene formation by eosinophil leukocytes: analysis with ion-pair HPLC and effect of the respiratory burst.
H.-S. Z. Physiol. 364 (8), 1029 - 1037, 1983

(265) TERANO, T., HIRAI, A., TAMURA, S., YOSHIDA, S.
Improved RP-HPLC assay for LTB_4 and HETE's.
Abstr. of Kyoto Conf. Eicos.

(266) STRIFE, R.J., MURPHY, R.C.
Stable isotope labeled 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. Analysis by negative ion chemical ionization mass spectrometry.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 13, 1 - 8, 1984

(267) BLAIR, I.A.
Quantitative analysis of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid.
Abstr. of Kyoto Conf. Eicos.

(268) MURPHY, R.C.
MS-quantitation and analysis of leukotrienes and other 5-lipoxygenase metabolites.
Prostaglandins 28 (5), 597 - 601, 1984

(269) RABINOVITCH-CHABLE, H., DURAND, J., ALDIGIER, J.C., CHEBROUX, P., GUALDE, N., BENEYTOUT, J.L., RIGAUD, M.
High efficiency capillary column GC-MS: analysis of the lipoxygenase pathway in eukaryot cells.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 13, 9 - 13, 1984

(270) WADDELL, K.A., BARROW, S.E., ROBINSON, C., ORCHARD, M.A., DOLLERC, C.T., BLAIR, I.A.
Quantitative analysis of prostanoids in biological fluids by combined capillary column GC negative ion chemical ionization MS.
Biomed. Mass. 11 (2), 68 - 74, 1984

(271) RIUTTA, A., SEPPALA, E., VAPAATALO, H.
A rapid sensitive method for detecting different arachidonic acid metabolites by thin-layer chromatography: the use of autoradiography.
J. Chromatogr. 307 (1), 185 - 189, 1984

(272) SHAK, S., GOLDSTEIN, I.M.
Omega-oxidation is the major pathway for the catabolism of leukotriene B_4 in human PMNL.
J. Biol. Chem 259 (16), 10181 - 10187, 1984

(273) FORD-HUTCHINSON, A.W., RACKHAM, A., ZAMBONI, R., ROKACH, J., ROY, S.
Comparative biological activities of synthetic LTB_4 and its omega-oxidation products.
Prostaglandins 25 (1), 29 - 37, 1983

(274) CLANCY, R.M., DAHINDEN, C.A.
Oxidation of leukotrienes of the omega-end: demonstration of a receptor for the 20-hydroxy-derivative of LTB_4 in human neutrophils and implications for the analysis of leukotriene receptors.
P. Nas. Biol. 81 (18), 5729 - 5733, 1984

(275) HARPER, T.W., WESTCOTT, J.Y., VOELKEL, N., MURPHY, R.C.
Metabolism of leukotrienes B_4 and C_4 in the isolated perfused rat lung.
J. Biol. Chem. 259 (23), 14437 - 14440, 1984

(276) LEE, C.W., LEWIS, R.A., COREY, E.J., AUSTEN, K.F.
Conversion of leukotriene D_4 to leukotriene E_4 by a dipeptidase released from the specific granule of human PMNL.
Immunology 48 (1), 27 - 35, 1983

(277) SIROIS, P., BROUSSEAU, Y.
Leukotriene transformation by guinea pig lungs.
Prostaglandins, Leukotriens, Med. 10 (2), 133 - 143, 1983

(278) KUO, C.G., JAKSCHIK, B.A.
Conversion of LTC_4 to D_4 and E_4 by plasma-membrane bound enzymes.
Fed. Proc. 42 (5), 1381, 1983 (Abstract).

(279) KRILIS, S., LEWIS, R.A., COREY, E.J., AUSTEN, K.F.
Bioconversion of C-6-sulfidopeptide leukotrienes by the responding guinea pig ileum determines the time course of its contraction.
J. Clin. Invest. 71 (4), 909 - 915, 1983

(280) VOELKEL, N.F.
Nonimmunological production of leukotrienes induced by platelet-activating factor.
Science 218, 286 - 288, 1982

(281) SCHATZ, M.
The eosinophil and the lung.
Arch. Int. Med. 142, 1515 - 1519, 1982

(282) FRUTEAU DE LACLOS, B., BRAQUET, P., BORGEAT, P.
Characteristics of leukotriene und Hete synthesis in human leukocytes in vitro: effect of arachidonic acid concentration.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 13, 47 - 52, 1984

(283) JAKSCHIK, B.A., KUO, C.G.
Subcellular localization of leukotriene-forming enzymes.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res. 11, 141 - 145, 1983

(284) BOERSTERLING, B., TRUDELL, J.R.
Evidence for leukotriene A_4 as an intermediate in the conversion of 5-HPETE to leukotriene B_4 catalyzed by cytochrome P-450.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 115 (3), 995 - 1001, 1983

(285) JEREMY, J.Y., MIKHAILIDIS, D.P., DANDONA, P.
The rat unrinary bladder produces prostacyclin as well as other prostaglandins.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med. 16, 235 - 248, 1984

(286) SETTY, B.N.J., STUART, M.J.
15-HETE inhibits human vascular cyclooxygenase. Potential role in diabetic vascular disease.
J. Clin. Invest. 77 (1), 202 - 211, 1986

(287) KELLEY, V.E., SUEVE, S., MUSINSKI, S.
Increased renal thromboxane production in murine lupus nephritis.
J. Clin. Invest. 77 (1), 252 - 259, 1986

(288) PATRONO, C., CIABATTINO, G., PUGLIESE, F., PIERUCCI, A., BLAIR, J.A., FITZGERALD, G.A.
Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans.
J. Clin. Invest. 77 (2), 590 - 594, 1986

(289) FOEGH, M.L., ALIJANI, M.R., HELFRICH, G.B., RAMWELL, P.W.
Eicosanoids and organ transplantation.
Ann. Clin. Res. 16, 318 - 322, 1984

(290) NAJARIAN, J.S., SUTHERLAND, D.E.R.
Kidney transplants for high risk patients.
Kidney International 23 (Suppl. 14), 10 - 15, 1983

(291) CAMERON, J.S.
Effect of the recipient's disease on the result of transplantation (other than diabetes mellitus).
Kidney International 23 (Suppl. 14), 24 - 33, 1983

(292) NYLANDER, W.A., SUTHERLAND, D.E.R., BENTLEY, F.R., SIMMONS, R.L., NAJARIAN, J.S.
15 to 20 years follow-up of renal transplants performed in the 1960's.
Transplant. Proc. 17 (1), 104 - 105, 1984

(293) STRØM, T.B., KUPIEC-WEGLINSKI, J.W., HEIDECKE, C.D., TILNEY, N.L.
The cellular and molecular basis of allograft rejection: fact and fancy.
Transplant. Proc. 17 (2), 801 - 805, 1984

(294) LEE, H.M., MENDEZ-PICON, G., GOLDMAN, M.H., MOHAKUMAE, T., POSNER, M.P.
The course of long term-survival in kidney transplantation: one center's experience.
Transplant. Proc. 17 (1), 106 - 107, 1984

(295) COLS, S., GALTON, J., TERASAKI, P.J.
Effect of the recipient's original disease on the outcome of renal transplantation.
Transplant. Proc. 17 (6), 2811 - 2814, 1985

(296) BOCKHORN, H., SCHAREK, W.D., HOPT, U.D., MÜLLER, G.H., RISLER, T.
Renal transplantation: is conventional therapy still justified?
Transplant. Proc. 17 (2), 115 - 119, 1984

(297) WAER, M., VANVENTERGHEM, Y., KIAN ANG, K., VAN DER SCHUEREN, E., MICHIELSEN, P., VANDEPUTTE,M.
Immunologic profiles of renal allograft recipients treated with three immunosuppressive regimes, including total lymphoid irradiation, cyclosporine A, and azathioprine.
Transplant. Proc. 17 (1), 656 - 661, 1984

(298) BRADLEY, J.A., MASON, D.W., MORRIS, P.J.
Mechanism of allograft rejection: mode of action of cyclosprorine A and passive enhancement.
Transplant. Proc. 17 (2), 841 - 843, 1984

(299) KRAMER, N.C., VAUGHN, W.K., BOLLINGER, R.R., ROHR, M.S., PETERS, T.G.
Comparison of cyclosporine A and conventional immunosuppressive therapy in renal transplantation: a prospective multicenter study.
Transplant. Proc. 17 (6), 2196 - 2201, 1985

(300) MATSURA, T., KUNIKATA, S., KANDA, H., AKIYAMA, T., KURITA, T.
Studies on the mode of action of cyclosporine A.
Transplant. Proc. 17 (6), 2712 - 2716, 1985

(301) GOODWIN, J.S., ATLURU, D., SIERAKOWSKI, S., LIANOS, E.A.
Mechanism of action of glucocorticoids: inhibition of T-cell proliferation and interleukin-2 production by hydrocortisone is reversed by LTB_4.
J. Clin. Invest. 77 (4), 1244 - 1250, 1986

(302) TSURUFUJI, S., KURIHARA, A., KISO, S., SUZUKI, Y., OHUCHI, K.
Dexamethasone inhibits generation in inflammatory sites of the chemotactic activity attributable to LTB_4.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 119 (3), 884 - 890, 1984

(303) FULLER, R.W., KELSEY, C.R., COLE, P.J., DOLLERY, C.T., MACDERMOT, J.
Dexamethasone inhibits the production of thromboxane B_2 and leukotriene B_4 by human alveolar and peritoneal macrophages in culture.
Clin. Sci. 67 (6), 653 - 656, 1984

(304) COHEN,N., WEBER, G., BANNER, B.L.
Analogs of arachidonic acid methylated at C-7 and C-10 as inhibitors of leukotriene biosynthesis.
Prostaglandins 27 (4), 553 - 562, 1984

(305) COREY, E.J., LANSBURY, P.T., CASHMAN, J.R., KANTNER, S.S.
Mechanism of the irreversible deactivation of arachidonate 5-lipoxygenase by 5,6-dehydroarachidonate.
J. Am. Chem. Soc. 106 (5), 1501 - 1503, 1984

(306) COREY, E.J., CASHMAN, J.R.
A new class of irreversible inhibitors of leukotriene biosynthesis.
J. Am. Chem. Soc. 107 (3), 713 - 715, 1985

(307) HOCK, C.E., LOPREST, L., LEFER, A.M.
Inhibitors of lipoxygenase products improve survival in traumatic shock.
Prostaglandins 28 (4), 557 - 570, 1984

(308) LEVINE, L.
Inhibition of the A 23187-stimulated leukotriene and prostaglandin biosynthesis of RBL-1 cells by non-steroidal antoinflammatory drugs, anti-oxidants, and Ca-channel blockers.
Biochem. Pharmacol. 32 (20), 3023 - 3026, 1983

(309) BACH, M.K., BRASHLER, J.R.
LTC_4-synthetase: a special glutathione-S-transferase. Properties of the enzyme and inhibitor studies with special reference to the mode of action of U 60 257, a selective inhibitor of leukotriene synthesis.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (3, Pt. 2), 353 - 357, 1984

(310) YAMAMOTO, S., YOSHIMOTO, T., FURUKAWA, M., HORIE, T., WATANABE-KOHNO, S.
Arachidonate 5-lipoxygenase and its new inhibitors.
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (3, Pt. 2), 349 - 352, 1984

(311) SEAMAN, W.S.
Human natural killer cell activity is reversibly inhibited by antagonists of lipoxygenation.
J. Immunol. 131 (6), 2953 - 2957, 1983

(312) SCHULTZE, G., STAHL, P.
Effect of cyclosporine A on the generation of prostanoids by cultured peripheral lymphocytes.
Transplant. Proc. 16 (5), 1214 - 1217, 1984

(313) FAN, T.P.D., LEWIS, G.P.
Effect of cyclosporine A and inhibitors of arachidonic acid metabolism on blood flow and cyclooxygenase products in rat skin allografts.
Br. J. Pharmacol. 81 (2), 361 - 371, 1984

(314) ADU, D., LOTE, C.J., TURNEY, J.H., MICHAEL, J., McMASTER, P.
Does Cyclosporine A inhibit renal prostaglandin synthesis?
Kidney International 26 (4), 629, 1984 (Abstract).

(315) NEILD, G.H., ROCCHI, G., IMBERTI, L., FUMAGALLI, F., BROWN, Z., REMUZZI, G., WILLIAMS, D.G.
Effect of cyclosporine A on prostacyclin synthesis by vascular tissue.
Thromb. Res. 32 (4), 373 - 379, 1983

(316) BAXTER, C.R., DUGGIN, G.G., HORVATH, J.S., HALL, B.M., TILLER, T.J.
Cyclosporine and renal prostaglandin biosynthesis.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 45 (1), 69 - 80, 1984

Lebenslauf

Am 23. Mai 1953 wurde ich, Gunter Beyer, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Henry Beyer und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Harnisch, in Chemnitz/Sachsen geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Grundschule in Stuttgart-Gaisburg und wechselte dann auf das Zeppelin-Gymnasium, Stuttgart, wo ich im Juni 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1973 begann ich das Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, das ich ab November 1976 an der Philipps-Universität Marburg fortführte und im Juni 1981 mit der Diplomprüfung abschloß. Die Diplomarbeit mit dem Titel „Biocoenose eines kleinen Baches. Quantitative Untersuchungen an einem künstlich angelegten Fließgewässer" führte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Remmert am FB Biologie-Zoologie der Philipps-Universität Marburg durch.

Im Wintersemester 1976 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg. Im April 1978 legte ich die Ärztliche Vorprüfung und im April 1980 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Nach dem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 1982 schloß ich mein Medizinstudium am 22. 4. 1983 mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Die Approbation als Arzt erhielt ich am 13. 5. 1983.

Vom August 1983 bis zum März 1985 arbeitete ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Robert-Bosch-Krankenhaus bzw. dem angeschlossenen Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart. In dieser Zeit wurde der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit angefertigt.

Seit April 1985 arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent an der Urologischen Universitätsklinik und Poliklinik (Direktor: Professor Dr. med. G. Rodeck) der Philipps-Universität Marburg.